VERLAUF DER FREISETZUNG VON BENZOESÄURE UND NATRIUM-BENZOAT AUS SUPPOSITORIEN IN VIVO UND IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
THOMAS KLUMPP
aus
FULDA

BONN 1985

VERLAUF DER FREISETZUNG VON BENZOESÄURE UND NATRIUM-BENZOAT AUS SUPPOSITORIEN IN VIVO UND IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
THOMAS KLUMPP
aus
FULDA

BONN 1985

Angefertigt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bonn

1. Referent : Priv.-Doz. Dr. R. Süverkrüp
2. Referent : Prof. Dr. F. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1985

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn
Pharmazeutische Technologie

Direktor : Prof. Dr. F. Müller

Druck: Rheinische Friedrich- Wilhelms-Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

1 Problemstellung 5

2 Literaturübersicht 7

2.1 Theorie 7

2.1.1 Rektale Applikation 7
2.1.2 Wirkstofffreisetzung aus Suppositorien 8

2.2 Prüfung des Schmelzverhaltens und der Wirkstofffreisetzung 9

2.2.1 Apparaturen zur Charakterisierung des Schmelzverhaltens 9
2.2.2 Apparaturen zur Bestimmung der Wirkstofffreisetzung 13
Rührgefäßmodelle 14
Durchflußzelle 18
Freisetzungsapparaturen mit Membranen 20

2.3 Methoden zur Bestimmung von in vivo-Freisetzungs- und Resorptionsverläufen 23

2.3.1 Statistische Momente 23
2.3.2 Massenbilanzverfahren nach Wagner-Nelson 26
2.3.3 Numerische Dekonvolution 28
2.3.4 Kurvenanpassung 31

2.4 Kumulative Freisetzung und Freisetzungsgeschwindigkeit 32

3 Materialien und Methoden 34

3.1 Testsuppositorien 34

3.1.1 Auswahl der Testsuppositorien 34
3.1.2 Testsubstanzen 35
3.1.3 Grundlagen 36
3.1.4 Herstellung von Suppositorien und Klysmen 37
3.1.5 Gewichts- und Gehaltseinheitlichkeit 38
3.1.6 Physikalische Stabilität der Suppositorien 38
Steigschmelzpunkt 39
Durchschmelzzeit 40

3.3 In vitro-Freisetzungsapparaturen 42

3.3.1 Apparatur I 42
3.3.2 Apparatur II 42
3.3.3 Apparatur III 42
3.3.4 Apparatur IV 43
3.3.5 Apparatur V 43
3.3.6 Akzeptormedium 44

3.4 Elektronische Speicherung und Verarbeitung der Daten 44

4 Versuchsdurchführung 44

4.1 In vitro-Versuche 44

4.1.1 Rührgefäßmethoden (Apparaturen I-III) 44
4.1.2 Apparatur IV 47
4.1.3 Apparatur V 47
4.1.4 Gehaltsbestimmung 48

4.2 In vivo-Versuche 49

4.2.1 Vorbereitung der in vivo-Versuche 49
4.2.2 Anordnung der in vivo-Versuche 49
4.2.3 Durchführung der in vivo-Versuche 50
4.2.4 Analytik 51

5 Ergebnisse 52

5.1 In vitro-Freisetzungsverläufe 52

5.2 In-vivo Konzentrations-Zeit-Verläufe 52

5.2.1 Ausmaß der Gesamtbenzoesäureausscheidung 52
5.2.2 Ausscheidungsgeschwindigkeiten 53
5.2.3 Resorption nach Gabe eines Klysmas 56

5.3 Rekonstruktion der in vivo-Freisetzung 56

5.3.1 Rekonstruktion des Resorptionsverlaufes 57
5.3.2 Rekonstruktion der in vivo-Freisetzung mittels numerischer Dekonvolution 58
5.3.3 Kurvenanpassung 60

6 Auswertung 62

6.1 Methoden der statistischen Auswertung 62

6.1.1 Wilcoxon-Rangsummentest 64
6.1.2 Wilcoxon-Vorzeichenrangtest 65
6.1.3 Test nach Kruskal und Wallis 66
6.1.4 Friedman-Rangsummentest 67
6.1.5 Diskriminanzanalyse 67

6.2 Auswertung der in vitro-Versuche 69

6.2.1 Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen der in vitro-Freisetzungsapparaturen 70
6.2.2 Auswertung Apparatur I 72
6.2.3 Auswertung Apparatur II 75
6.2.4 Auswertung Apparatur III 77
6.2.5 Auswertung Apparatur IV 79
6.2.6 Auswertung Apparatur V 81
6.2.7 Diskriminanzanalyse 83

6.3 Auswertung der in vivo-Versuche..... 85

6.3.1 Relative Bioverfügbarkeit..... 86
6.3.2 Mittlere Verweilzeit..... 89
6.3.3 Varianz der Verweilzeiten..... 91
6.3.4 Diskriminanzanalyse..... 93
6.3.5 Zusammenfassung der in vivo-Ergebnisse..... 95

7 In vivo-/in vitro-Korrelation..... 97

7.1 Rangkorrelation der Kenngrößen in vivo und in vitro..... 98

7.1.1 relative Bioverfügbarkeit und freigesetzter Dosisanteil..... 98
7.1.2 mittlere Verweilzeit..... 100
7.1.3 Varianz der Verweilzeiten..... 102

7.2 Lineare Transformation der Zeitachsen..... 104

7.2.1 Mittlere Verweilzeiten..... 105
7.2.2 Levy-Plot..... 107
7.3.3 Freisetzungszeiten für einzelne Dosisanteile..... 111
-Test auf Vorliegen einer äquivalenten Verteilung beliebiger Form..... 115
Freisetzungsgeschwindigkeiten der Dezilendifferenzen..... 116

7.4 Diskussion der Ergebnisse..... 121

8 Zusammenfassung..... 125

9 Anhang

A : Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen..... 128
B : Ergebnisse der in vivo-Untersuchungen 133
C : Symbole..... 140

10 Literaturverzeichnis..... 142

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546503_0013

1 Problemstellung

Das wichtigste biopharmazeutische Qualitätsmerkmal einer Arzneiform ist der Verlauf der Wirkstofffreisetzung nach der Applikation. Bei Arzneistoffen, die schnell resorbiert werden, hängt die Resorptionsgeschwindigkeit oft von der Freisetzung des Wirkstoffes ab. In solchen Fällen kann die in vitro-Prüfung der Liberationseigenschaften einen wesentlichen Beitrag zur Qualitätskontrolle und Optimierung von Arzneimitteln leisten.

Methoden, mit denen sich die Wirkstofffreisetzung aus Tabletten, Dragees, und Kapseln beurteilen lassen, finden sich z.B. in der USP XXI (1) und der BP 1980 (2). Für halbfeste Arzneiformen und therapeutische Systeme fehlen bislang offizinell anerkannte Verfahren. Damit besteht die Möglichkeit, entsprechende Methoden systematisch zu untersuchen und gezielt zu entwickeln. Bei Suppositorien wurde in den letzten Jahren in einer Anzahl von Arbeiten das Freigabeverhaltn untersucht und eine Reihe von Freisetzungsapparaturen vorgeschlagen (3,4,5,6,7,8). Die Apparaturen wurden meist nur zur Lösung eines speziellen galenischen Problems eingesetzt. Es fehlen vergleichende Untersuchungen, um die Qualität der Geräte beurteilen zu können.

In dieser Arbeit sollen anhand von in vivo- und in vitro-Experimenten quantifizierbare Bewertungskriterien für die Auswahl einer geeigneten Apparatur erstellt werden. Zu diesem Zweck wurden Apparaturen verwendet, die bereits in der Literatur beschrieben und bei den mit ihnen untersuchten Problemstellungen erfolgreich eingesetzt wurden.

Eine Freisetzungsapparatur sollte bei vertretbarem experimentellem Aufwand biologisch relevante Unterschiede zwischen verschiedenen Zubereitungen erkennen lassen. Bei Zubereitungen mit identischen Eigenschaften sollten wiederholte Versuche zu den gleichen Ergebnissen kommen. Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen einer Apparatur sind Forderungen, die schwer miteinander in Einklang zu bringen sind.

Die untersuchten Modelle liefern lediglich Aussagen über die Wirkstofffreisetzung aus der untersuchten Arzneiform. Resorptions-,

Verteilungs- und Eliminationsvorgänge können mit ihnen nicht simuliert werden. Diese Eigenschaften des biologischen Systems müssen für die untersuchte Substanz im in vivo-Experiment abgeklärt und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Die in vitro-Modelle ersetzen keine in vivo-Untersuchungen. Aus ethischen und auch finanziellen Gründen ist eine routinemäßige Prüfung der Chargenqualität von Arzneimitteln am Menschen nicht möglich. In gewissen Grenzen können sie durch in-vitro Methoden ersetzt werden, wenn ihre Ergebnisse in nachweisbarer Beziehung zu den in vivo-Befunden stehen.

Ob galenische Faktoren einen nennenswerten Einfluß auf die Bioverfügbarkeit zeigen, kann man nur im in vivo-Experiment feststellen. Durch pharmakokinetische Verfahren können aus Plasma- und Urindaten in vivo-Freigabeverläufe berechnet werden. Diesen Verfahren basieren auf impliziten Voraussetzungen, die nicht einfach zu formulieren sind.

Die in vivo Freisetzungsprofile helfen bei der Auswahl der geeigneten in vitro-Freisetzungsapparatur. Die Güte der in vivo-/in vitro-Korrelation, die mit einer Apparatur erreicht werden kann, ist ihr wichtigstes Qualitätskriterium.

Das Aufstellen von Toleranzgrenzen für zulässige Änderungen im in vitro- Freisetzungsverhalten hängt von den in-vivo nachgewiesenen Änderungen der Bioverfügbarkeit ab. Wenn ein Zusammenhang in ausreichend vielen Fällen gefunden wurde, dann erlauben die in vivo-Ergebnisse Vorhersagen über mögliche Freigabeänderungen im biologischen System. Damit sind Bewertungen der Bioäquivalenz verschiedener Chargen oder Lagerzustände (Stabilitätsprobleme) eines Produktes möglich. Die Bewertung der Bioäquivalenz verschiedener Produkte unterschiedlicher Zusammensetzung ist allein mit in vitro-Verfahren ohne in vivo-Studien nicht möglich.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Theorie

2.1.1 Rektale Applikation

Suppositorien sind verschieden geformte einzeldosierte Arzneiformen, die zum Einführen in das Rektum oder die Vagina bestimmt sind und dort den Arzneistoff freigeben (9). Die Suppositoriengrundlagen bestehen aus Kakaobutter, Glyceringelatine, Polyethylenglykolen, Fettsäureestern von Polyethylenglykolen, Hartfetten oder gehärteten Pflanzenölen (1). Den größten Anteil halten heute Suppositorien auf Fettbasis. Bei Arzneistoffen mit systemischer Wirkung bietet die rektale Applikation folgende Vorteile:

-keine Veränderung des Arzneistoffes durch Einflüsse des oberen Gastro- Intestinalbereichs
-keine Reizungen des oberen Magen-Darm-Traktes
-keine Geschmacksbeeinträchtigung
-Applikation bei nicht ansprechbaren Patienten
-bei Patienten mit möglichen Suizidabsichten (8)
-für einige Arzneistoffe wird eine Umgehung des first pass Effekts beschrieben (10)

Dem stehen als Nachteile gegenüber:

-geringe Resorptionsfläche, die zudem keine physiologische Resorptionsaufgabe hat
-geringe Flüssigkeitsmenge, in der sich der Wirkstoff auflösen kann
-Arznei- oder Hilfstoffe können bei Reizung der Schleimhaut zu einer reflektorischen Defäkation führen.
-Resorptionsabruch durch Stuhlgang
-Akzeptanzprobleme

Vor allem der letzte Punkt führte zu einer kulturell und geogra-

phisch unterschiedlichen Verbreitung der Suppositorien. Traditionelle Vorbehalte gegenüber dem "shocking way of application" bestehen vor allem in den angelsächsischen Ländern. Aufgrund unterschiedlicher Therapiegewohnheiten finden sich bei den Indikationsgebieten ebenfalls länderspezifische Unterschiede (11).

2.1.2 Wirkstofffreisetzung aus Suppositorien

Die Freigabe des Wirkstoffes aus der Suppositoriengrundlage heraus ist die Voraussetzung für die nachfolgende Passage des gelösten Wirkstoffes durch die Rektalmembran. Deshalb erscheint es sinnvoll, möglichst früh im Rahmen der galenischen Entwicklung die Freisetzung in vitro zu optimieren. Der Freisetzungsvorgang wird im wesentlichen von fünf, teilweise gleichzeitig ablaufenden Vorgängen bestimmt (12).

- Aufschmelzen
- Spreitung
- Transportvorgänge innerhalb des Suppositoriums (Diffusions-, Konvektions- oder Sedimentationsvorgänge)
- Phasenübergang des gelösten oder ungelösten Arzneistoffes aus der Grundlage in die Flüssigkeit des Rektums
- Auflösung des Wirkstoffes in der Grundlage und/oder in der Rektalflüssigkeit

Bei Hartfettmassen muß die Grundlage geschmolzen sein, damit der Wirkstoff an die Grenzfläche zwischen Fett und Rektalflüssigkeit gelangen kann. Die Spreitung verändert die für die Freisetzung zur Verfügung stehende Oberfläche. Diffusions- oder Sedimentationsvorgänge bestimmen den Wirkstofftransport. Lösungs- oder Suspensionssuppositorien stellen in Hinblick auf das Schmelzverhalten unterschiedliche Ansprüche an die Suppositorienmasse (13,14). Durch die Auswahl einer geeigneten Suppositorienmasse können Schmelzpunkter-

höhungen (Suspensionen) oder -depressionen (Lösungen) ausgeglichen werden. Mischformen mit teilweise in der Grundlage gelöstem Wirkstoff und auf der Suppositorienoberfläche auskristallisiertem Wirkstoff sind denkbar, aber im Hinblick auf die pharmazeutische Qualität nicht akzeptabel. Während der Lagerung gehen Glyceride in Kristallmodifikationen über, die bei Raumtemperatur stabiler sind. Daraus ergeben sich physikalische Stabilitätsprobleme wie z.B. die Nachhärtung der Suppositorien (15). Die Zusammenhänge zwischen Modifikationsumwandlungen in der Grundlage und verwendeten Arznei- oder Hilfstoffen sind noch nicht geklärt. Auch die physikalischen Faktoren, die den Übergang von Arzneistoffen an flüssigen Lipid-Wasser Grenzflächen beeinflussen, müssen noch untersucht werden (16). Die Wirkstofffreisetzung aus Suppositorien ist von sehr vielen Faktoren abhängig, die nur selten in überschaubarer Weise durch einfache physikalische Gestzmäßigkeiten erklärt werden können. Deshalb ist es nur schwer möglich zu entscheiden, welche physikalischen Untersuchungsmethoden für die Beurteilung der biopharmazeutischen Qualität benötigt werden. Die in vivo oder in vitro ermittelten Freisetzungskurven sind jeweils das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens. Trotzdem sollten in jedem Fall die physikalischen und chemischem Ursachen der beobachteten Veränderungen geklärt werden.

2.2. Prüfung des Schmelzverhaltens und der Wirkstofffreisetzung

2.2.1 Das Schmelzverhalten von Suppositorien

Der Zusammenhang zwischen Schmelzverhalten und Bioverfügbarkeit eines Suppositoriums wurde von Hennig (17) bereits 1959 in vivo und in vitro untersucht. Spätere Arbeiten von Neuwald (18,19), Krogerus und Tolvi (20) beschäftigten sich mit dem Einfluß der Schmelztemperatur der Grundlage auf die Resorption. Neuwald und Kunze (18) verglichen die Abgabe von Salicylaten aus verschiedenen Fett-

grundmassen. Sie fanden gute Freigabeeigenschaften bei Suppositorien, deren Grundlagen bei Temperaturen deutlich unter der Körpertemperatur schmolzen. Bei Suppositorienmassen, deren Steigschmelzpunkt entweder der Körpertemperatur entspricht oder sie überschreitet, wurde eine deutlich verringerte Resorption beobachtet.
In den Pharmakopöen sind hauptsächlich Vorschriften zur Bestimmung des Schmelzverhalten der Grundlage enthalten. Die Ph. Eur. II (21) und das ÖAB 9 (22) lassen den Steigschmelzpunkt von Adeps solidus bestimmen. Die Pharm. Helv. VI (23) fordert die Überprüfung des Tropfpunktes und des Erstarrungspunktes. In der USP XXI (1) werden nur Hinweise zur Problematik der Bioverfügbarkeit von Zäpfchen gegeben. Grundsätzlich wird für Suppositorien eine Lagerung im Kühlschrank empfohlen. Die Monographie "Fette" schreibt vor, wie der Steigschmelzpunkt der Grundlage zu bestimmen ist.
Die Bestimmung des Steigschmelzpunktes (21) ist für Suppositorien problematisch, da sie bei diesem Verfahren aufgeschmolzen werden müssen. Durch Energiezufuhr werden Langzeitmodifikationen der Fettgrundlage zerstört (24). Temperaturabhängige Alterungsvorgänge werden beim Schmelzen rückgängig gemacht und können daher nicht erkannt werden. Von vielen Autoren wurden Methoden gesucht, um das Schmelzverhalten des Suppositoriums in seiner unveränderten Form zu untersuchen. Büchi und Oesch (25) erwärmten ein Suppositorium im Reagenzglas und beobachteten den "Erweichungsgrad".
Hennig (17) stellte bereits 1959 eine Apparatur vor, bei der das Suppositorium in einem Zellophanschlauch eingebracht wurde, der von erwärmten Wasser umspült wurde (Abb. 2.1). Damit ist es möglich, ein den physiologischen Verhältnissen entsprechendes Akzeptorvolumen zu verwenden. Durch den hydrostatischen Druck auf den Zellophanschlauch soll der Druck der in vivo zusammenliegenden Rektalwand simuliert werden. Auch bei dieser Apparatur wird ebenso wie bei der Apparatur nach Setnikar und Fantelli(25) der Erweichungsgrad subjektiv vom Beobachter festgestellt. Das Verschwinden des undurchsichtigen Kerns erfolgt nicht schlagartig und kann vor allem bei Suspensionssuppositorien zu Unsicherheiten führen. Im Prinzip vergleichbare Ergebnisse liefert die Methode der Ph. Eur. II (Abb. 2.1). Das Suppositorium wird in ein Metallgehäuse gege

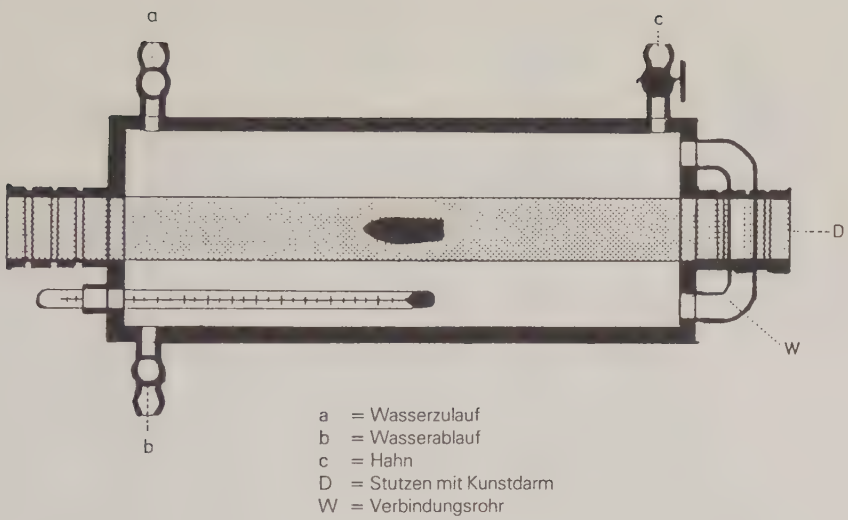


Abb. 2.1 Gerät zur Beobachtung des Schmelzverhaltens nach Hennig (17)

ben und in ein Gefäß mit 37 ±0.2 °C warmen Wasser getaucht. In festgelegten Intervallen wird die Apparatur unter Wasser umgedreht. Das Erkennen des Erweichungsgrades und damit die Definition, wann der Zerfall des Suppositoriums eingetreten ist, ist bei diesen Methoden problematisch. Die Ph. Eur.II läßt den Erweichungsgrad eines Suppositoriums durch Berühren mit einem Glasstab feststellen. Die Apparatur nach Krowczynski (26) vermeidet diesen Nachteil. 5ml Wasser werden in das Glasrohr oberhalb der Einschnürung eingefüllt. Das Zäpfchen wird eingeführt und die Zeit gemessen, die ein Glasstab benötigt, um auf die Einschnürung des Rohres zu treffen (Abb. 2.3). Diese leistungsfähige Apparatur wurde bei vielen Arbeiten teilweise modifiziert benutzt und in mehrere osteuropäische Pharmakopöen übernommen(27,28,29).

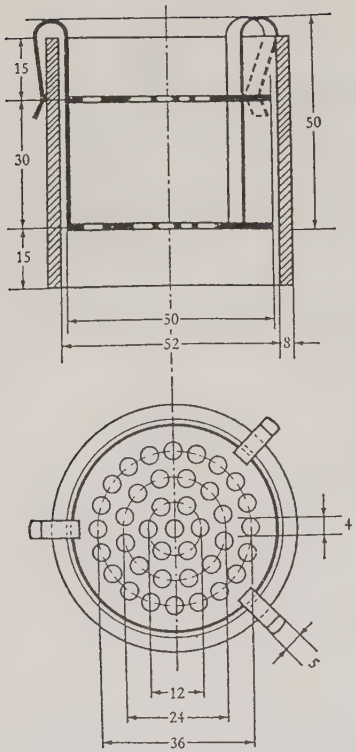


Abb. 2.3

Gerät zur Prüfung des Schmelzverhaltens von Suppositorien

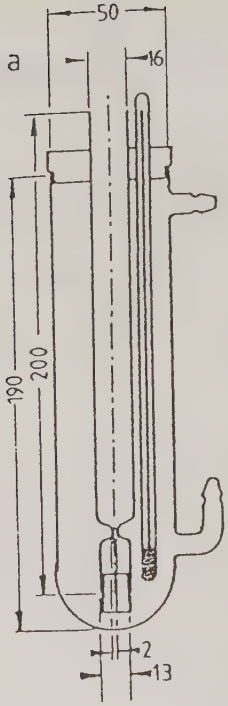


Abb. 2.2

Gerät zur Prüfung des Schmelzverhaltens von Suppositorien nach KROWCZYNSKI (26)

2.2.2 Apparaturen zur Bestimmung der Wirkstofffreisetzung

Viele Autoren haben sich bemüht, die Freisetzungseigenschaften eines Zäpfchens unter angenähert physiologischen Bedingungen zu bestimmen. Die verschiedenen Methoden wurden in einer Reihe von Übersichtsartikeln referiert (11,29,30,31,32).

Für die hier diskutierten Fragen sind vor allem Apparaturen interessant, die nur die Wirkstofffreisetzung berücksichtigen. Apparaturen, die Resorptions- und Verteilungsvorgänge nachahmen (33,34,35) wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die einfachste Methode zur Bestimmung der Freisetzung stellt die Reagenzglas-Schüttelmethode (36) dar. Ein Suppositorium wird in einem Reagenzglas mit 37°C warmen Wasser geschüttelt. Nach einer festgelegten Zeit wird abgekühlt, das Akzeptormedium von der erstarrten Grundlage getrennt und analysiert. Konzentrations-Zeitverläufe können so nur durch eine Untersuchungsreihe an mehreren Zäpfchen gewonnen werden.

Der Freisetzungsverlauf aus einem einzelnen Suppositorium wurde auch mit leicht modifizierten Tablettenzerfallstestern untersucht. Dabei steigt die Wirkstoffkonzentration im Akzeptormedium zwar auf unphysiologisch hohe Werte an, aber es ist möglich, kontinuierlich Proben zu ziehen. Bei diesen Methoden stört die Eigenschaft vieler Fettgrundlagen, mit dem Akzeptormedium Emulsionen zu bilden. Die Oberfläche der geschmolzenen Suppositorienmasse ist nicht reproduzierbar, und die Analytik wird gestört. Diese Probleme wurden mit einer Reihe von speziell für Suppositorien entwickelten Freisetzungsapparaturen angegangen (11, 29).

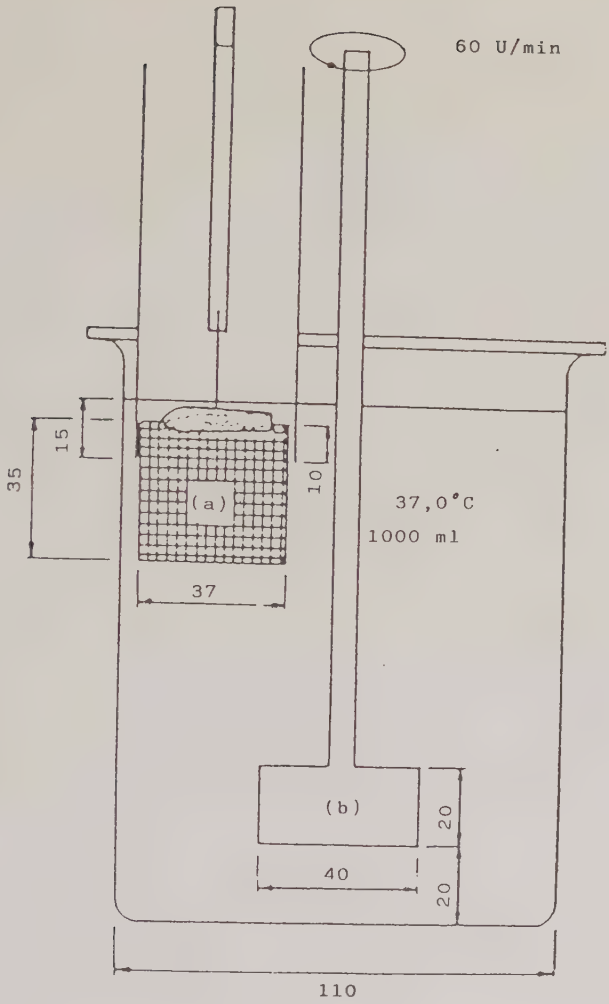
Die in der Literatur beschriebenen Freisetzungsmodelle lassen sich in zwei Klassen einteilen:

- Rührgefäße mit einem großen Akzeptorvolumen, das meistens während des Versuches nicht ausgetauscht wird.
- Durchflußzellen mit einem kleinem Volumen und stets erneuertem Akzeptormedium.

Beide Gerätetypen können sowohl mit einem offenen als auch geschlossenem Akzeptorkreislauf betrieben werden.

Rührgefäßmodelle

Das Suppositorium wird in einem Behälter mit Akkzeptormedium (Wasser, Pufferlösung) befestigt. Durch das relativ große Volumen werden für die meisten Arzneistoffe "sink"-Bedingungen erreicht. Für die Agitation des Akzeptors sorgt ein Blatt- oder Propellerrührer. Die Proben werden dem Prüfmedium in bestimmten Zeitabständen entnommen, so daß man kumulative Konzentrations-Zeitverläufe erhält.
Von Cox und Breimer(3,37),(Abb. 2.4) wurde 1977 eine apparativ einfache Rührgefäßmethode vorgestellt. Ein rundes Glasrohr (Durchmesser 37 mm)ragt in ein 1000 ml Becherglas. Das Suppositorium wird aufgespießt und vor dem Aufschmelzen unter der Lösungsmitteloberfläche arretiert. Nach dem Aufschmelzen nimmt das Suppositorium eine konstante Kontaktfläche ein. Spreitungseigenschaften der Grundlage, die in vivo zu einer vergrößerten Kontaktfläche führen, können mit dieser Apparatur nicht erfaßt werden. Anderseits verbessert die Elimination des Faktors Spreitung die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Unter dem Probenrohr befindet sich ein Drahtkörbchen. Es soll verhindern, daß Teile des geschmolzenen Zäpfchens in Bereiche geringerer Agitation innerhalb der Apparatur gelangen. Durch eine Öffnung im Deckel können kontinuierlich oder diskontinuierlich Proben gezogen werden.
De Blaey und Rutten-Kingma (38) untersuchten mit diesem Gerät die Änderung der Freisetzungseigenschaften von Aminophyllinzäpfchen während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen. Die Freigabeeigenschaften verschlechterten sich bei den verwendeten Suppositorien. Dieser Effekt trat mehr oder weniger stark bei den drei untersuchten Grundlagen Kakaobutter, Witepsol H15 und Suppocire AM auf. Der Freigabeverlauf konnte nicht auf Grund des Schmelzpunktes vorhergesagt werden.



U/min = Umdrehungen pro Minute

a = Drahtkörbchen

b = Rührerblatt

Abb. 2.4 Freisetzungsapparatur nach COX (37), Apparatur I

Schoonen et al.(4), (Abb. 1.5) stellten 1976 eine Rührgefäßmethode vor, bei der die Spreitungseigenschaften des Suppositoriums berücksichtigt werden. Eine runde Glasplatte taucht in ein zylindrisches Gefäß ein. Dadurch wird der Inhalt in zwei miteinander kommunizierende Strömungsbereiche geteilt. Oberhalb der Platte dreht sich ein dreiblättriger Propeller. Unter der Platte, in einem verhältnismäßig ruhigen Strömungsbereich, steckt das Suppositorium auf einen kleinen Metalldorn . Das Suppositorium schmilzt auf und wird je nach Spreitungsvermögen eine größere oder kleinere Fläche unter der Glasbarriere einnehmen. Proben werden durch den Deckel entnommen. Schoonen et al. (4) untersuchten mit dieser Apparatur den Einfluß der Lipophilie und der Korngröße des Arzneistoffes auf das Freigabeverhalten. Bei den wasserlöslichen Natrium-Salzen von Phenobarbital und Salicylsäure bedingt eine Vergrößerung der eingesetzten Korngröße eine Verbesserung der Freisetzung. Pulver, die in Hartfett schwer löslich sind, sedimentieren in Abhängigkeit von Gewicht und Korngröße zur Grenzfläche der geschmolzenen Masse. Durch die Zugabe von 5% Aerosil (R972) konnte die Viskosität der geschmolzenen Grundlage erhöht werden, wodurch die Freisetzungsgeschwindigkeit bei Suspensionszäpfchen abnahm . Bei der in der Grundlage teilweise löslichen Säure Phenobarbital bzw. Salicylsäure sind überwiegend Diffusionsvorgänge für die Freigabe des Arzneistoffes aus der Grundlage verantwortlich, der Einfluß der Korngröße ist hier geringer. In anderen Arbeiten (39,40) wurde von demselben Arbeitskreis die Freisetzung von Benzoesäure und Natriumbenzoat aus Witepsol H15 untersucht. Das gröbere Pulver des wasserlöslichen Natriumbenzoats erbrachte höhere Freisetzungsraten als die feinere Siebfraktion. Auf die Freisetzung von Benzoesäure, die in Witepsol H15 teilweise löslich ist, hat die Änderung der Korngröße nur einen geringen Einfluß.

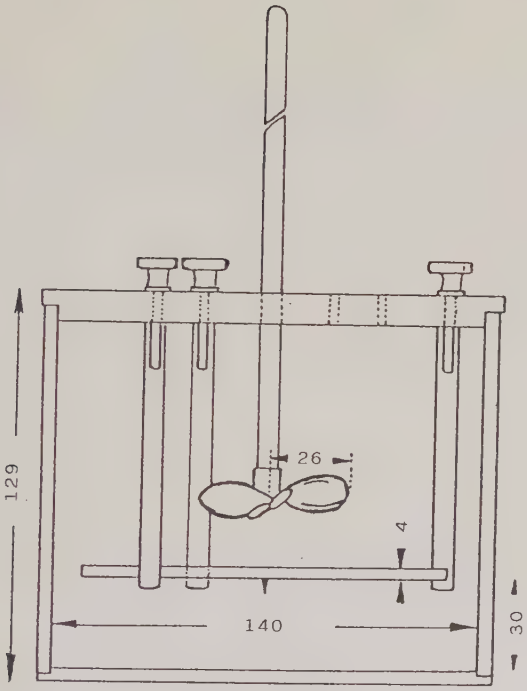
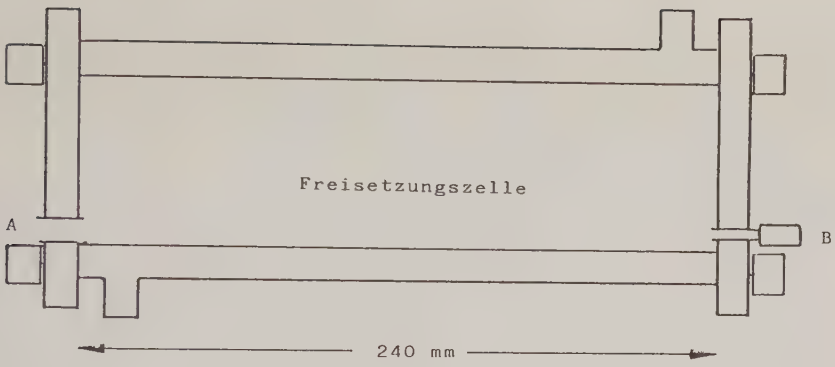


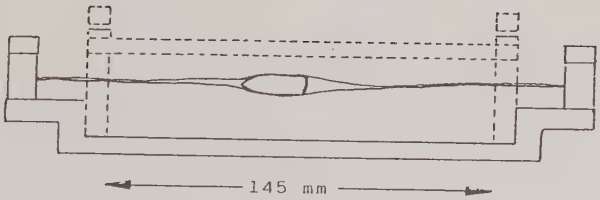
Abb. 2.5 Freisetzungsapparatur nach SCHOONEN (4), Apparatur II

Durchflußmethoden

Durchflußmethoden werden vor allem bei der Prüfung oraler Arzneiformen erfolgreich angewendet, sind aber noch nicht sehr verbreitet (41). Die Arzneiform wird in einer Kammer mit geringem Totvolumen von ständig erneuertem Akzeptormedium umspült. Vorteilhaft sind das leichte Einstellen von pH-Zeit-Gradienten und die Möglichkeit, auch bei schwer löslichen Arzneistoffen "sink"-Bedingungen einzuhalten (5,42). Für eine physiologische Simulation der Verhältnisse im Rektum sind die gebräuchlichen Volumina zu groß und die Strömungsbedingungen unrealistisch. Durch die große Strömungsgeschwindigkeit werden in vitro hohe Freisetzungsgeschwindigkeiten gefunden. Trotzdem verläuft die Freisetzung nicht schneller als in vivo (6).
Die Durchflußzelle bietet die Möglichkeit, den Auflösevorgang sowohl unter "sink" als auch "non sink" Bedingungen zu untersuchen. Bei der Freisetzung eines Wirkstoffes aus einer Fettmatrix ist die Forderung nach "sink"- Bedingungen unter Umständen sinnvoll , da in vivo der relativ langsamen Auflösung in der Rektalflüssigkeit ein rascher Wirkstoffabtransport durch Resorption folgen kann. Bei langsamen Strömungsgeschwindigkeiten in der Durchflußzelle lassen sich auch "non-sink" Bedingungen einhalten.
Durchflußzellen können als offene oder geschlossene Systeme betrieben werden. Beim offenen System wird stets frisches Akzeptormedium durch die Probenkammer gepumpt und der Gehalt bestimmt. Der Wirkstoffgehalt ist der Freisetzungsgeschwindigkeit direkt und der Durchflußgeschwindigkeit umgekehrt proportional. Aus analytischen Gründen kann es sinnvoll sein, die Zelle im geschlossenen Kreislauf zu betreiben. Die kumulativen Konzentrations-Zeitverläufe, die sich dabei ergeben, entsprechen den in den Rührgefäßen erhaltenen.

Langenbucher und Rettig stellten 1977 eine Durchflußzelle vor (Abb. 2.6), die mit geringen Abwandlungen in den DAC 1979 (41) zur Prüfung von peroralen Arzneiformen übernommen wurde. Für den Einsatz bei Suppositorien schlugen sie vor, die Zubereitung in einem umgekehrte Napf mit einer Nadel zu befestigen (5). Dieser Vorschlag konnte sich in der Praxis nicht durchsetzen. Es folgten eine Reihe





Halterung für den Dialyseschlauch

Abb. 2.7 Freisetzungsapparatur nach TUKKER (8), Apparatur V

a Einlaß des Akzeptormediums
b Auslauf des Akzeptormediums

apparativer Verbesserungen, bei denen versucht wurde, durch Einsatz von Filtern und Umkehrung der Strömungsrichtung die Suppositorienmasse in der Zelle zu halten. Möller (7,43) untersuchte anhand von in vivo- und in vitro- Methoden an Indometacin-Suppositorien die Brauchbarkeit solcher Apparaturen.

Roseman und Mitarbeiter (44) verglichen 1980 die Freigabe von Benzocain aus unterschiedlichen Zäpfchengrundlagen. Dabei verwendeten sie eine Durchflußzelle, in der das Suppositorium in einem Glaskugelbett fixiert wurde. Die Zelle wurde von oben nach unten von demineralisiertem Wasser mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 ±0.5 ml/min durchströmt. Das Akzeptormedium wurde im geschlossenem System umgepumpt und der Gehalt an kumulativ freigesetztem Benzocain photometrisch bestimmt. Die Glaskugeln vermindern das Totvolumen und erhöhen die Strömungsgeschwindigkeit an der geschmolzenen Suppositorienmasse. Je nach Spreitungsfähigkeit und Schmelzverhalten der Grundlage wird diese eine unterschiedlich große Oberfläche einnehmen. Durch den Druck der Glaskugeln und die laminaren Strömungsverhältnisse sollen die Freisetzungsverläufe besser reproduzierbar sein als in herkömmlichen Freisetzungsapparaturen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten in vitro-Freisetzungen wurde die von Langenbucher (5) vorgeschlagene Zelle entsprechend dem Vorschlag von Roseman (44) modifiziert. Das Akzeptormedium durchströmt die Zelle mit dem in Glaskugeln eingebetteten Suppositorium von oben nach unten . Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde auf 5ml/min reduziert.

Freisetzungsapparaturen mit Membranen

In einer Reihe von Veröffentlichungen wurden Apparaturen vorgestellt, bei denen die geschmolzene Zäpfchenmasse durch eine Membran vom Akzeptormedium getrennt ist (45,34). Das Suppositorium befindet sich mit einer geringen Flüssigkeitsmenge in einer Dialysezelle, fixiert in einem Dialyseschlauch oder -sack. Diese Vorrichtung taucht entweder in ein Rührgefäß (45,46,47) oder wird in einer

Durchflußzelle (34,48) vom Akzeptormedium umspült. Der Wirkstoff muß sich wie im Rektum in einem geringen Volumen auflösen. Beim Durchtritt durch die Membran wird der Wirkstoff von der Grundlage vollständig getrennt und abtransportiert. Da bei diesen Apparaturen nicht die Gefahr besteht, daß Fetttröpfchen in die zu vermessende Lösung gelangen, kann eine stärkere Agitation in der Akzeptorphase stattfinden. Die untersuchten Wirkstoffe müssen allerdings die Membran ungehindert passieren können, bzw. der Einfluß der Membran muß berechenbar bleiben. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im beobachteten System muß durch die Freigabeeigenschaften des Suppositoriums und nicht durch die Membrangängigkeit des jeweiligen Wirkstoffes bedingt sein. Erfolgt die Diffusion des Wirkstoffes durch die Membran zu langsam, so werden Unterschiede im Freigabeverhalten nivelliert.

Tukker et al. (49) schlugen 1981 eine Apparatur vor, mit der sie die Wirkstofffreigabe aus sieben handelsüblichen Aminophyllinzäpfchen untersuchten (Abb.2.7). In weiteren Arbeiten (8) verglichen sie die mit der Apparatur erhaltenen Freisetzungsverläufe mit in vivo-Ergebnissen. Experimentelle Untersuchungen an Hunden über die Motilität des Enddarms führten zu weiteren Modifikationen der Apparatur. Das Suppositorium befindet sich in einem 20 cm langen Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose in einer Durchflußzelle. In einem geschlossenen System werden zwei Liter demineralisiertes Wasser mit einer Durchsatzrate von ca. 1,5 Liter pro Minute umgewälzt. Zusätzlich läßt sich bei der Apparatur nach Tukker im Gegensatz zu ähnlichen älteren Apparaturen (50) die Darmperistaltik simulieren. In festen Zeitabständen wird der hydrostatische Druck auf den Dialyseschlauch erhöht. Dadurch wird die Lipoid-Wasseroberfläche des geschmolzenen Suppositoriums vergrößert, und es bildet sich eine stetig erneuerte Grenzfläche zwischen Suppositorienmasse und Membran aus. Aufgrund ähnlicher Überlegungen entwickelte Dibbern (6) eine im Akzeptormedium rotierende Durchflußzelle zur Bestimmung der Wirkstofffreigabe aus hydrophoben Trägern.

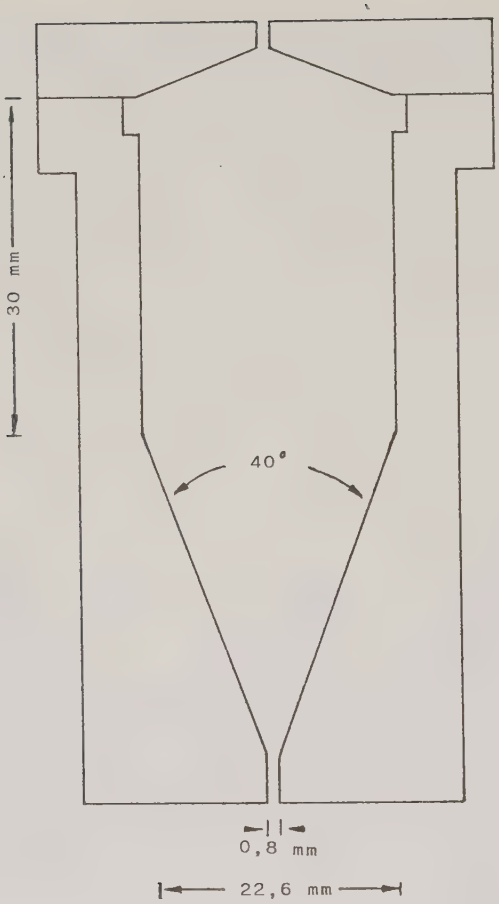


Abb. 2.6 Durchflußzelle nach LANGENBUCHER (5), Apparatur IV

2.3 Methoden zur Bestimmung der in vivo-Freisetzung

Mit Hilfe von in vitro-Tests für Suppositorien kann lediglich die Liberation eines Arzneistoffes aus einer Grundlage in ein wäßriges Akzeptormedium beurteilt werden. Resorptionsvorgänge können mit in vitro-Freigabeapparaturen nicht erfaßt werden. Ihr Verlauf und der der Verteilung sowie der Resorption müssen getrennt vom in vivo-Freisetzungsvorgang bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird der Arzneistoff intravenös appliziert. Resorptions- und Verteilungsvorgänge lassen sich nach der Gabe eines Klysma nebeneinander bestimmen.

Analog zu den in vitro beobachteten kumulativen Freisetzungsverläufen und Freisetzungsgeschwindigkeitsprofilen kann der Verlauf der in vivo- Freisetzung durch eine Reihe von unterschiedlichen pharmakokinetischen Verfahren aus den experimentellen Daten bestimmt werden (51,52,53). Die Voraussetzung einer dosisunabhängigen (linearen) Pharmakokinetik für die Testsubstanz ist allen Verfahren gemeinsam.

Eine Beschreibung der in vivo-Auflösung durch wenige Parameter ist mit der Momentanalyse möglich (Kap. 2.3.1). Mit Hilfe der Massenbilanz kann man den Resorptionsverlauf rekonstruieren, der in vielen Fällen von der Freisetzung des Wirkstoffes bestimmt wird (Kap. 2.3.2). Ein allgemeines Verfahren zur Analyse linearer Systeme ist die numerische Dekonvolution.

In der Biopharmazie können mit dieser Methode Freisetzungs- und Resorptionsverläufe getrennt voneinander rekonstruiert werden (Kap. 2.3.3). Mit Hilfe der Kompartimentmodelle lassen sich über eine Kurvenanpassung vergleichbare Ergebnisse erhalten (Kap. 2.3.4).

2.3.1 Statistische Momente

Freigabe- und Resorptionsverläufe können als Verteilungsfunktionen aufgefaßt werden (55, 56, 57). Die hypothetische Verweildauer eines Arzneistoffmoleküls in einer Arzneiform während des Freisetzungs-

vorganges entspricht einer bestimmten Zeitspanne. Die Menge der Verweildauern aller Moleküle kann als empirische Verteilung betrachtet werden. Eine Möglichkeit, statistische Verteilungen zu charakterisieren, ist die Bestimmung ihrer Momente . Betrachtet man die Freisetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit f(t) als Wahrscheinlichskeitsdichtefunktion, so sind die gewöhnlichen Momente r-ter Ordnung (m_r) wie folgt definiert (Gl. 2.1):

$$m_r = \int_0^\infty t^r \, f(t) \qquad \text{Gl 2.1}$$

Insbesondere gilt für die ersten drei gewöhnlichen Momente (Gl. 2.2-4) und die Varianz der Verweildauern (Gl. 2.5):

$$m_0 = \int_0^\infty f(t) \qquad \text{Gl. 2.2}$$

$$m_1 = \int t \, f(t) = \bar{t} = \text{MRT} \qquad \text{Gl. 2.3}$$

$$m_2 = \int_0^\infty t^2 \, f(t) \qquad \text{Gl. 2.4}$$

$$\text{Var}_t = m_2 - m_1^2 = \text{VRT} \qquad \text{Gl. 2.5}$$

Das 0. Moment entspricht der Fläche unter der Kurve. Bei statistischen Verteilungsfunktionen entspricht die Fläche definitionsgemäß der Wahrscheinlichkeit, mit der insgesamt ein Ereignis eintritt. (z. B. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmtes Molekül freigesetzt ist, wenn alle Moleküle freigesetzt sind, entspricht der Fläche mit der Größe eins). Bei der Beschreibung von Freisetzungsgeschwindigkeitsfunktionen ist das 0. Moment ein Skalierungsfaktor, der der freigesetzten Menge entspricht. Das 1. gewöhnliche Moment entspricht dem arithmetischem Mittel der Verweil-dauern eines Arzneistoffes in einer Arzneiform. Die mittlere Verweildauer (MRT Mean Residence Time) ist ein Maß für die mittlere Freiset-

zungsgeschwindigkeit. Das 2. zentrale Moment (Gl. 2.5) ist ein Maß für die Breite der Verteilung und entspricht der Varianz der Verweildauern. Mit Hilfe der höheren Momente lassen sich Maßzahlen für Kurtosis (Steilheit) und Schiefe der Funktion definieren.
Mit Hilfe der Momentanalyse ist auch eine modellgebundene Beschreibung von Konzentrations-Zeitverläufen möglich. Bei einem Vorgang 1.Ordnug entspricht die mittlere Verweildauer dem Kehrwert der Geschwindigkeitskonstanten. Voegele et al. (57) wiesen darauf hin, daß die Parameter einfacher Auflösungsgesetze über die mittlere Verweilzeit und die Varianz der Verweilzeiten geschätzt werden können (0. Ordnung, 1. Ordnung, Quadrat- und Kubikwurzelgesetz und RRSWB- Funktion).
Allgemein gilt für lineare Systeme, daß sich die mittleren Verweilzeit eines Gesamtsystems aus den mittleren Verweilzeiten der Teilsysteme additiv zusammensetzt. Die mittlere Verweilzeit der Substanz im biologischen System ($\bar{t}_{tot}$) setzt sich zusammen aus der mittleren Verweilzeit des Arzneistoffes in der Arzneiform ($\bar{t}_{diss}$) und der mittleren Verweilzeit der Substanz nach der Freisetzung im Körper ($\bar{t}_{sys}$, Gl. 2.6). Damit ist die mittlere Auflösungszeit im Rektum ($\bar{t}_{diss}$) gleich der Differenz der mittleren Verweilzeiten der Substanz im Gesamtsystem ($\bar{t}_{tot}$) und der mittleren Verweilzeiten nach der Freisetzung ($\bar{t}_{sys}$, Gl. 2.7).

$$\bar{t}_{tot} = \bar{t}_{diss} + \bar{t}_{sys} \qquad \text{Gl. 2.6}$$

$$\bar{t}_{diss} = \bar{t}_{tot} - \bar{t}_{sys} \qquad \text{Gl. 2.7}$$

Die Beschreibung von Freisetzungsverläufen erfolgt in der Regel mit wenigen Momenten (0. Moment, 1. Moment, VRT). Aus den statistischen Momenten mit einer kleinen Rangzahl lassen sich Kurvenverläufe nicht eindeutig rekonstruieren. Daher sind Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Freisetzung aufgrund der ersten Momente nur bedingt möglich.
Zur Berechnung der Momente ist die vollständige Erfassung der Fläche unter der Freisetzungskurve ausschlaggebend. Wenn der Frei-

setzungsvorgang mit dem Ende der Versuchszeit nicht beendet ist, muß extrapoliert werden. Besonders auf die Berechnung höherer Momente haben die Meßpunkte bei späteren Zeiten einen großen Einfluß, da sie in die Berechnung mit der r-ten Potenz des jeweiligen Momentes r-ter Ordnung eingehen. Bei unvollständigen Freisetzungskurven hängt die Bestimmung der Momente von der Güte der Daten, der Regelmäßigkeit des Verlaufes und der Qualität der verwendeten Extrapolationsmethode ab.
Hilfsweise kann man Momente auch für einen Anteil der eingesetzten Dosis berechnenen (M_0).

$$m_{norm} = M_o^{-1} \int_o^t t^r \, dM(t) \qquad \text{Gl. 2.8}$$

Man beobachtet, ähnlich wie bei Arzneibuchprüfungen auf Wirkstoffreisetzung, nur bis zur Freigabe eines Quantils (z.B. 80%) des Sollgehaltes. Die so erhaltenen Momente erlauben nur eine Aussage über den festgelegten Bruchteil des gesamten Konzentrations-Zeitverlaufes.

2.3.2 Massenbilanzverfahren nach Wagner-Nelson

Der Algorithmus des Wagner-Nelsons Verfahren (58) basiert auf dem Ein-Kompartiment-Modell. Über den Verlauf der Wirkstofffreigabe und Resorption werden keinerlei Annahmen gemacht. Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (k_e) kann aus den terminalen, in vivo beobachteten Daten oder aus einem Eichexperiment geschätzt werden, in dem der Arzneistoff in Lösung verabreicht wird. Mit Hilfe der Massenbilanz in den Kompartimenten Rektum, Plasma und Urin wird die zu jedem Zeitpunkt noch nicht aus dem Rektum resorbierte Substanzmenge bestimmt.
In Abbildung 2.8 ist der einfachste Fall für die Massenbilanz dargestellt. Die Ausscheidung des Wirkstoffes erfolgt vollständig und unverändert. Das Modell ist auch anwendbar, wenn der Wirkstoff schnell metabolisiert wird (z.B. Benzoesäure zu Hippursäure).

Abb: 2.8 Einkompartiment-Modell zum Wagner-Nelson Verfahren

Die endgültig im Urin ausgeschieden Menge Arzneistoff entspricht zu jedem Zeitpunkt der Summe der Arzneistoffmengen am Resorptionsort (R), im Körper (K), und im Urin (U).

$$U_{\infty} = R + K + U \qquad \text{Gl. 2.9}$$

Der Übergang des Arzneistoffes aus dem Körper in den Urin erfolgt nach:

$$\frac{dU}{dt} = k_e \, K \qquad \text{Gl. 2.10}$$

In Gleichung (Gl. 2.9) eingesetzt ergibt sich daraus für die im Rektum verbleibende Menge (Gl 2.12):

$$U_{\infty} = R + k_e^{-1} \frac{dU}{dt} + U \qquad \text{Gl. 2.11}$$

$$R = U_{\infty} - k_e^{-1} \frac{dU}{dt} - U \qquad \text{Gl. 2.12}$$

Wird der Wirkstoff teilweise metabolisiert, so erhält man für den zu jedem Zeitpunkt den noch nicht resorbierten Anteil der insgesamt

auf allen Eliminationswegen ausgeschiedenen Wirkstoffmenge (E_∞):

$$\frac{K}{E_\infty} = 1 - \frac{\frac{U}{dt} + k_e U}{k_e U_\infty} \qquad \text{Gl. 2.13}$$

Das Wagner-Nelson-Verfahren erlaubt keine getrennte Beschreibung des Auflöse- und Absorptionsvorganges. Nur wenn sichergestellt ist, daß die Liberation deutlich langsamer als die Resorption verläuft, werden Unterschiede im Freigabeverhalten der Testzubereitungen über den Resorptionsverlauf sichtbar. Ein entsprechendes Verfahren für ein Zweikompartiment-Modell wurde von Loo und Riegelmann (59) angegeben. Im Gegensatz zur Methode nach Wagner und Nelson (58) benötigt man ein Eichexperiment, bei dem der Wirkstoff rasch intravenös verabreicht wird.

2.3.3. Numerische Dekonvolution

Die numerische Dekonvolution (60, 61, 62) kommt ohne Annahmen über ein zugrunde liegendes pharmakokinetisches Modell aus. Der Körper wird als System betrachtet, das auf jeden Impuls linear antwortet (Abb. 2.9). Als Impulsfunktion (I(t)) zur Definition des biologischen Systems wird bei rektaler Applikation ein Klysma verwendet. Die Systemfunktion (G(t)) entspricht der Impulsantwort des Systems. Die Ausgangsfunktion des Körpers erhält man im Experiment durch die Urinausscheidungskurve (A(t)). Zwischen diesen drei Funktionen besteht folgende Beziehung:

$$I(t) * G(t) = A(t) \qquad \text{Gl. 2.14}$$

Die Ausgangsfunktion A(t) ist das Ergebnis einer Faltungsoperation (*) zwischen der Impulsfunktion I(t) und der Systemfunktion G(t).

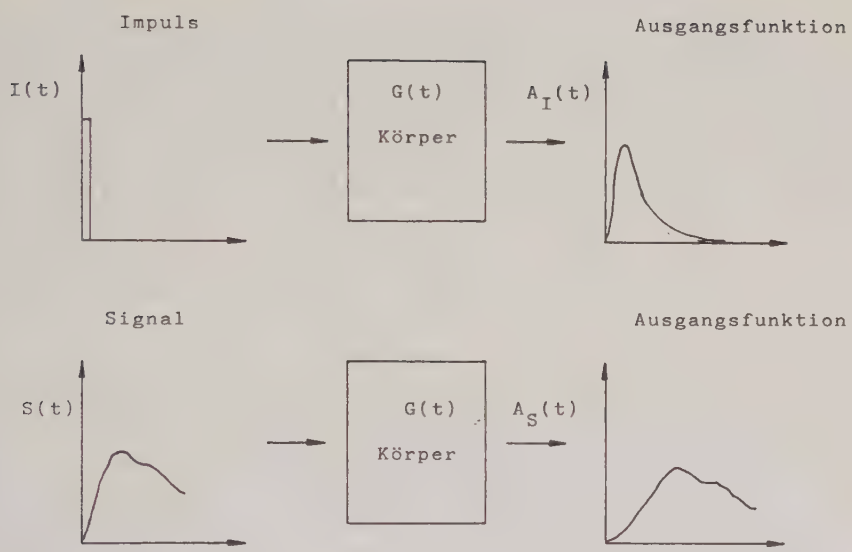


Abb. 2.9 Dekonvolution
Körper als "Black Box"
I(t) Impulsfunktion
A(t) Ausgangsfunktion nach Impuls
S(t) Eingangsfunktion (Signal)
A(t) Ausgangsfunktion nach Signal

Die Linearität des Systems ist gegeben, wenn die Multiplikation der Impulsfunktion mit dem Faktor a einer entsprechenden Multiplikation der Ausgangsfunktion mit a entspricht (Homogenitätsbedingung, 60).

$$a\ I(t) * g(t) = a\ A(t) \qquad \text{Gl. 2.15}$$

Der Ausgangsfunktion des Systems auf die Applikation eines Suppositoriums entspricht dann der Superposition der gewichteten Antwortfunktionen einer Folge von Impulsen (Konvolution). Wenn die Intervalle (T) zwischen den Impulsen beliebig klein sind, läßt sich die Konvolution durch das Faltungsintegral (Gl 2.16) darstellen. Anstelle der diskreten Zeitwerte (T) wird die Variable τ eingeführt (60).

$$A = \int_o^t I(\tau)\ G(t - \tau)\ d\tau \qquad \text{Gl. 2.16}$$

Durch relativ einfache in der Literatur beschriebene Algorithmen (61, 62) läßt sich die Dekonvolution als Umkehrung der Konvolution numerisch bestimmen. Sukzessiv wird die in vivo-Freisetzung aus dem vorherigen Intervall der Ausgangsfunktion (A (t)) mit Hilfe der gewichteten Impulsantwortfunktion bestimmmt. Die Methode ist empfindlich gegen zufällige Schwankungen der experimentellen Daten. Numerische Instabilitäten bei der Bestimmung der in vivo-Freisetzungskurve lassen sich durch vorherige Glättung der Datensätze beheben. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben. Dabei besteht die Gefahr, nicht nur zufällige Fehler zu beseitigen, sondern auch systematische Fehler einzuführen. Die Verwendung von "Splines" (63,64) erlaubt es, den Grad der Glättung vorzugeben. Ein mechanisches Modell für die Spline-Funktion stellt ein über die Datenpunkte gelegtes elastisches Lineal dar, das aufgrund seiner Steifheit eine interpolierende Kurve mit einer minimalen Krümmung bildet (sog. Straklatte, engl. spline). Dazu werden die Kurvenverläufe zwischen den Intervallgrenzen durch Polynome approximiert, die so gewählt werden, daß der Übergang zwischen ihnen stetig erfolgt. Der mittlere Abstand des interpolierten Kurvenverlaufs von

den Datenpunkten kann über die wählbare Summe der Fehlerquadrate festgelegt werden.

2.3.4 Kurvenanpassung

Das hier verwendete Verfahren zur Rekonstruktion von Invasionsvorgängen basiert auf pharmakokinetischen Kompartimentmodellvorstellungen (65,66). Bei der numerischen Dekonvolution wird das biologische System durch seine Impulsantwortfunktion definiert. Kompartimentmodelle haben demgegenüber den Vorteil, physiologisch interpretierbar zu sein. Sie lassen sich schrittweise definieren, z.B. können Parameter in Eichexperimenten bestimmt und in anschließenden Untersuchungen als bekannt vorausgesetzt werden. Ähnlich wie bei der numerischen Dekonvolution kann der Resorptionsverlauf durch eine Folge impulsähnlicher Vorgänge nullter oder erster Ordnung dargestellt werden. Ist es möglich, Verteilung und Elimination durch Kompartimentmodelle zu beschreiben, so können die Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden (siehe: Massenbilanzmethoden). In der Praxis können nach der Applikation von Arzneimitteln in den seltensten Fällen einfache Invasionsvorgänge nullter oder erster Ordnung beobachtet werden. Beliebige Invasionsverläufe lassen sich annähernd durch eine Reihe zeitlich aufeinander folgender Eingangsfunktionen nullter bzw. seltener erster Ordnung (Phasen) beschreiben. Diese Phasen stimmen in der Regel mit den Intervallen der Probenziehung überein. Jeder Phase entspicht eine eigene Antwort-funktion und nach ihrem Abruch eine Korrekturfunktion, die die gleiche Form aufweist. Aus ihrer Überlagerung entsteht wieder eine Ausgangsfunktion, die hier allerdings nicht numerisch, sondern mit Hilfe des pharmakokinetischen Modells berechnet wird. Beliebige Kompartimentmodelle, bei denen die oben beschriebenen Invasionsvorgänge stattfinden, lassen sich durch ein System von Differentialgleichungen beschreiben. Allgemein können solche Gleichungssysteme über Laplace Transformationen gelöst werden (67, 68). Alle Lösungen bestehen aus einer Summe von Expotentialtermen, mit deren Hilfe es möglich ist, den Verlauf von Urin- oder Plasmaspiegeln vollständig

zu beschreiben.
Experimentell gewonnene Plasma- und Urindaten sind mit Fehlern behaftet. Die Parameter der zugrunde gelegten Modelle müssen deshalb iterativ durch Ausgleichsrechnung bestimmt werden. Hier wurde der Nelder-Mead-Simplex-Algorithmus verwendet (66).

2.4 Kumulative oder differentielle Darstellung von Konzentrations-Zeit-Verläufen

In der Literatur werden Freisetzungsverläufe meistens in der kumulativen Form dargestellt. In dieser Form erhält man sie unmittelbar bei den Rührgefäßmethoden der Arzneibücher.
Jede Probe, die nach einem bestimmten Zeitraum aus dem Auflösegefäß gezogen und analysiert wird, enthält neben der Information über die Wirkstofffreisetzung, die im letzten Sammelintervall freigesetzt wurde, auch die Information über den gesamten vorangehenden Freisetzungsverlauf. Bei der Integration der Freisetzungsgeschwindigkeit wird der im Probenintervall freigesetzten Menge (Nutzsignal) ein apparativer und analytischer Fehler überlagert, dessen Erwartungswert Null ist. Die Menge des im letzten Zeitintervall freigesetzten Arzneistoffes macht so nur einen kleinen Teil der analytisch bestimmten Menge aus. Dadurch erhält man eine optisch gefälligeren Form als bei der differentiellen Darstellung. Durchflußzellen in einem offenen System gestatten die direkte Bestimmung der Freisetzungsgeschwindigkeitsprofil. Dieser Vorteil geht beim geschlossenen System verloren. Die Argumentation, daß eine kumulative Wirkstoffbestimmung aus analytischen Gründen vorzuziehen sei, ist nur schwer nachvollziehbar, da sich die Bestimmung der freigesetzten Menge im Probenintervall dadurch nicht verbessert. Reicht die Empfindlichkeit des analytischen Verfahren nicht aus, um niedrige Wirkstoffkonzentrationen nachzuweisen, und läßt sich dies nicht durch eine geeignetere Analytik beheben, so kann die Konzentration im abfließenden Medium durch eine Senkung der Durchflußgeschwindigkeit erhöht werden. Dies ist aber nur sinnvoll, wenn dadurch nicht die Sättigung des Lösungsmittels in der Umgebung des

Wirkstoffes beeinflußt wird.

Bei der weiteren mathematischen Bearbeitung kumulativer Daten ist zu beachten, daß die statistische Unabhängigkeit der Beobachtungen nicht mehr gewährleistet ist. Wie Boxenbaum (69, 70) zeigte, kommt man zu systematisch fehlerhaften Werten, wenn man versucht, die Modellparameter durch Kurvenanpassung an kumulative Daten zu schätzen.

Bei der Darstellung von Geschwindigkeits-Zeit-Verläufen treten Schwankungen und Ungenauigkeiten deutlicher hervor. Die statistische Unabhängigkeit der Daten ist jedoch gegeben, deshalb ist es einfacher, das zutreffende Modell zu erkennen und seine Parameter zu schätzen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Testsuppositorien

3.1.1 Auswahl der Testsuppositorien

In dieser Arbeit wurden vier Formulierungen untersucht. Sie unterschieden sich deutlich in ihren Freigabeeigenschaften, um in vivo Unterschiede zwischen den einzelnen Testzubereitungen mit einer geringen Versuchszahl aufzeigen zu können. Einfache Bewertungskriterien wie Steigschmelzpunkt, Durchschmelzzeit und Dosiereinheitlichkeit liegen bei allen Testsuppositorien im Bereich von Fertigpräparaten (15).
Bei den Testsuppositorien wurden die Hydroxylzahl der Grundlage (19, 40, 71) und die Wasserlöslichlkit der Testsubstanz (39, 72, 73) variiert (Tabelle 3.1). Als Testsubstanz wurde entsprechend einem Vorschlag von Moolenaar (74) die schwer wasserlösliche Benzoesäure und ihr gut wasserlösliche Natriumsalz verwendet. Die Hydroxylzahl der Fettgrundlagen beruht auf dem Partialestergehalt und ist ein Maß für die Polarität der Grundlage. Eine hohe Hydroxylzahl verbessert die Löslichkeit hydrophiler Substanzen in der Grundlage und ihr Emulgiervermögenq. Daraus kann sich eine schlechtere Freisetzung ergeben, da Arzneistoffe in der Regel aus solchen Grundlagen am besten resorbiert werden, in denen sie am schlechtesten löslich sind (11).

Versuchsbezeichnung		Faktor A	Faktor B
NH15	(1)	-	-
BH15	(a)	+	-
NW35	(b)	-	+
BW35	(ab)	+	+

Faktor A	oberes Niveau	Benzoesäure
	unteres Niveau	Natriumbenzoat
Faktor B	oberes Niveau	Witepsol H15
	unteres Niveau	Witepsol W35

Tabelle 3.1 2 Faktorenversuchsplan

3.1.2 Testsubstanzen

Quick (75) führte Benzoesäure im Jahr 1933 als Testsubstanz zur Leberfunktionsprüfung ein. Benzoesäure ist ein relativ untoxisches Konservierungsmittel. Die Dosis letalis beträgt bei Ratten nach oraler Gabe für Benzoesäure 1,1 g/kg und 2,3 g/kg für Natriumbenzoat. In der Nahrungsmittelindustrie werden bis zu 0.1% Benzoesäure zur Konservierung von Lebensmitteln mit saurem pH-Wert zugelassen. Die im deutschen Lebensmittelgesetz vorgeschriebene maximal zulässige Tagesdosis beträgt 0.6 g/d (76, 77). F.Moolenaar et al.(74) führten Benzoesäure 1978 als Testsubstanz zur Untersuchung rektaler Arzneiformen am Menschen ein. Sie konnten nachweisen, daß nach rektaler Gabe die Resorption schnell und vollständig erfolgt. Benzoesäure wird in der Leber an Glycin gebunden und als Hippursäure quantitativ renal ausgeschieden.
Die biologische Halbwertszeit liegt nach Böttger (78) bei ca. 30 Minuten. Bei normaler Nahrungsaufnahme beträgt die ausgeschiedene endogene Menge Hippursäure 1,0 - 2,5 g/d, die im Körper gebildete Hippursäure stammt größtenteils aus den Aromaten pflanzlicher Nah-

rungsstoffe (76). Moolenaar et al. (74) und Böttger et al. (78) beobachteten, daß der endogene Plasmaspiegel nach zwölfstündigem Nahrungsentzug unter die Nachweisgrenze absinkt.
Benzoesäure ist in Wasser schwer löslich (5,4g/1000ml). Der pKa-Wert beträgt 4,2 und der pH der gesättigten Lösung liegt bei 2,3 (76,79).

3.1.3 Grundlagen

Witepsol H15 und Witepsol W35 entsprechen der Monographie Hartfett der Ph. Eur. II . Witepsol H15 ist in gekühltem Zustand spröde und brüchig. Aufgrund der kurzen Erstarrungszeit ist Witepsol H15 besonders für automatische Zäpfchengießanlagen geeignet. Witepsol W35 besitzt durch den größeren Anteil an Mono- und Di-Glyceriden eine höhere Hydroxylzahl als Witepsol H15. Bei starker Abkühlung bleibt es weicher als Witepsol H15. Die Grundlagen wurden so ausgewählt, daß sie sich bei den Fettkennzahlen im wesentlichen nur in ihrer Hydroxylzahl unterscheiden (80).

	WITEPSOL H15	WITEPSOL W35
Hydroxylzahl	15 max.	40-50
Steigschmelzpunkt °C	33,5-35,5	33,5-35,5
Erstarrungspunkt °C	32,5-34,5	27,0-32,0
Jodfarbzahl	3 max.	3 max.
Säurezahl	0,2 max.	0,3 max.
Verseifungszahl	230-240	225-235
Jodzahl	3 max.	3 max.
Unverseifbares	0,3 max.	0,3 max.

Tabelle: 3.2 Fettkennzahlen der verwendeten Grundlagen (80)

3.1.4 Herstellung der Suppositorien und Klysmen

Aus Natriumbenzoat- und Benzoesäurepulver wurden die Korngrößenfraktionen 90-125 µm auf einem Luftstrahlsieb (Alpine) abgetrennt (16). Gröbere Partikel wurden zunächst mit einem Sieb der Maschenweite 125 µm abgetrennt. Danach wurde der Durchgang auf dem 90 µm Sieb vom Feingut getrennt. Jede Siebung dauerte eine Stunde.
Die Suppositorienmassen wurden auf über 100 °C erhitzt, um definierte Ausgangsbedingungen zu schaffen, und danach langsam abgekühlt. Bei 40 °C wurden die Testsubstanzen zugesetzt. Die Ansätze wurden auf 10% (G/G) Benzoesäure oder dazu äquivalent 11,8 % Natriumbenzoat eingestellt. Nach dem Ausgießen auf eine Stahlplatte von Raumtemperatur wurden die Massen tiefgefroren und danach geraspelt. Die wirkstoffhaltigen Grundlagen wurden in dunklen, dichtverschlossenen Glasgefäßen drei Wochen lang bei 32 °C getempert. Danach wurden die geraspelten Massen bis zum Verbrauch bei Zimmertemperatur aufbewahrt.
24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Suppositorienmassen in einer Spindelsuppositorienpresse verpreßt.

Die Klysmen enthielten 0,200 g Natriumbenzoat in 10 ml Flüssigkeit (0,5% Methylcellulose 400 cP in 10 ml Citrat-Puffer (9), der pH-Wert betrug 5,4 entsprechend dem von Kakemiet al.(81) gefundenen pH-Wert des Rectums).

Benzoesäure, pulv. , Merck, 6100 Darmstadt
Natriumbenzoat, pulv. , Syncchem Hamburg
Die Suppositoriengrundlagen wurden von der Firma Dynamit-Nobel AG. zu Verfügung gestellt.

3.1.5 Gewichts- und Gehaltseinheitlichkeit

Die Prüfung der Gewichtseinheitlichkeit wurde bei frisch gepreßten Suppositorien nach der Vorschrift des EuAB II durchgeführt (21). Die maximal beobachteten Abweichungen vom mittleren Gewicht waren kleiner als 5% . Damit lagen alle Suppositorien im Bereich der einfachen Prüfgrenze.
Die Gehaltseinheitlichkeit wurde direkt aus der geraspelten Masse bestimmt. Jeweils 2,00 g wurden in 50 ml Chloroform gelöst und mit 200 ml 5%-iger (G/G) di-Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die photometrische Gehaltsbestimmung erfolgte bei 272 nm in 0,1 n-HCl.

Proben-nummer	Benzoesäure H15 %	Natriumbenzoat W35 %
1	9,94	9,39
2	9,37	9,90
3	9,78	9,69
4	9,94	10,28
5	10,31	10,26
6	9,42	9,43
$\bar{x}$	9,79	9,83
rel. s [%]	3,62	3,98

Tabelle 3.3 Gehaltseinheitlichkeit der Testsuppositorien

3.2 Physikalische Stabilität der Suppositorien

In einer Reihe von Arbeiten wird die Nachhärtung von Suppositorien auf Hartfettgrundlage untersucht (15,82,83). Dafür sind je nach Lagertemperatur mehr oder weniger rasche Modifikationsumwandlungen der Kristallstruktur verantwortlich. Dieser Vorgang kann sich bei

Raumtemperatur über mehrere Monate hinziehen. Diese Alterungserscheinungen wurden auch bei den hier verwendeten wirkstoffhaltigen Suppositorienmassen beobachtet. Sie könnten die Versuchsergebnisse mit einem zeitlichen Trend überlagern und verfälschen. Eine Lagerung der Testsuppositorien bei Kühlschranktemperaturen würde den Alterungsvorgang nur verzögern. Um die Nachhärtung zu vermindern werden im industriellen Maßstab den Suppositorienmassen Soja-Lecithine zugesetzt, oder es werden niedrigschmelzende Mischungen von Hartfetten eingesetzt (11). Beide Methoden würden die Zusammensetzung von Testsuppositorien unübersichtlicher machen. Durch eine Temperierung direkt nach der Herstellung lassen sich die Testzäpfchen in ihre energetisch stabilste Form überführen. Bei der Testsubstanz Benzoesäure sind keine temperaturbedingten Instabilitäten zu befürchten.
Der Verlauf der Alterung läßt sich bei den Suppositorien anhand des des veränderten Schmelzverhalten beobachten (Kap. 3.6.1, Kap. 3.6.2).

3.2.2 Steigschmelzpunkt

Bei der Herstellung der wirkstoffhaltigen Suppositorienmasse wurden Schmelzpunktröhrchen 1 cm hoch vom unteren Ende mit geschmolzener Suppositorienmasse gefüllt und zusammen mit der geraspelten Suppositorienmasse getempert und gelagert. Proben, die während des Temperns bei 32 °C geprüft wurden, wurden vor der Untersuchung vier Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Schmelzpunktbestimmung erfolgt nach der Vorschrift des Ph.Eur. II.
Abbildung 3.1 zeigt den Anstieg des Steigschmelzpunktes der vier unterschiedlichen Formulierungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die Werte blieben nach der Temperung während des gesamten Versuchzeitraumes stabil. Die Kombination aus Benzoesäure und Witepsol H15 besitzt den niedrigsten Steigschmelzpunkt, Natriumbenzoat in Witepsol W35 den höchsten. Dieses Ergebnis entspricht der allgemeinen Beobachtung, daß in der Zäpfchengrundlage lösliche Wirkstoffe den Schmelzpunkt herabsetzen und nichtlösliche suspen-

dierte Wirkstooffe den Schmelzpunkt erhöhen (71).

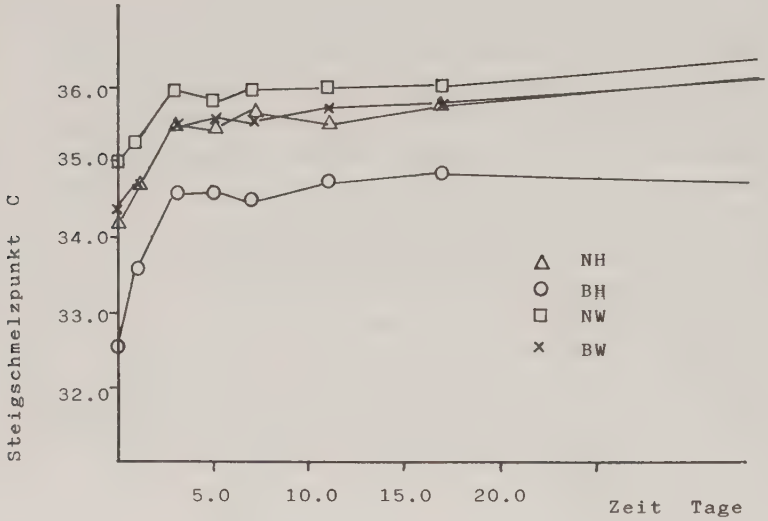


Abb. 3.1 Abhängigkeit des Steigschmelzpunktes von der Lagerzeit bei 32 C (n = 6)

3.2.3 Durchschmelzzeit

Mit einer modifizierten Apparatur nach Krowczynski wurde die Durchschmelzzeit in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung bei 32 °C untersucht. Auch hier findet während der Alterungsphase eine schnelle Änderung des Schmelzverhaltens statt (Abb. 3.2). Benzoesäure in Witepsol H15 besitzt die kürzeste Durchschmelzzeit, die Kombination aus Natriumbenzoat und Witepsol W35 die längste. Die gefundene Reihenfolge entspricht in wesentlichen dem Steigschmelzpunkten der jeweiligen Testsuppositorien. Die Methode ist weniger reproduzierbar, als die Bestimmung des Steigschmelzpunktes.

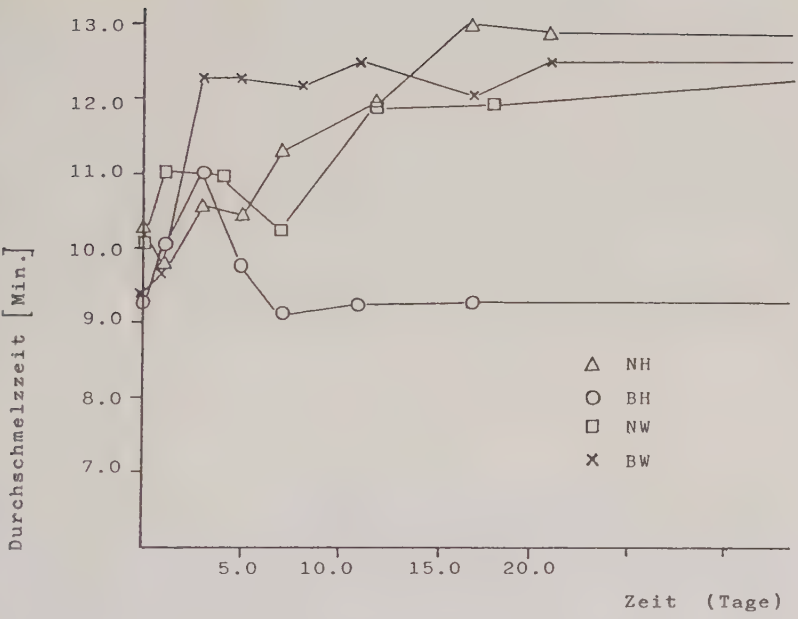


Abb 3.2 Abhängigkeit der Durchschmelzzeit von der Lagerzeit bei 32 °C (n=3)

3.3 In vitro-Freisetzungsapparaturen

Fünf Prüfgeräte wurden aus der Literatur nachgebaut. Es handelt sich dabei um drei Rührgefäßmethoden, ein Membranmodell und eine Durchflußzelle. Die Ergebnisse der Orginalarbeiten und ähnliche Apparaturen anderer Autoren sind im Kapitel 2.2.2 beschrieben.

3.3.1 Apparatur I

Die von Cox (3) (Abb. 2.4) beschriebene Apparatur konnte einfach nachgebaut werden. Das Drahtkörbchen (Durchmesser 37 mm) soll verhindern, daß Teile der geschmolzenen Suppositorienmasse in andere Teile der Apparatur gelangen. Die Rührgeschwindigkeit betrug 60 U/Min.

3.3.2 Apparatur II

Dabei handelte es sich um eine modifizierte Cox-Apparatur. Das Drahtkörbchen (Abb. 2.4) wurde entfernt, um die Flüssigkeitsagitation an der Grenzfläche zwischen geschmolzener Suppositorienmasse und Akzeptormedium zu erhöhen. Das Glasrohr tauchte bei diesen Versuchen 2 cm tief in die Flüssigkeit ein, damit keine geschmolzene Zäpfchengrundlage herausgespült werden konnte.

3.3.3 Apparatur III

Die Apparatur III entsprach der von Schoonen vorgeschlagenen Freisetzungsapparatur (4) (Abb. 2.5). Im Gegensatz zu Apparatur I und II wurde die Spreitung der Suppositorienmasse nicht durch ein Glasrohr begrenzt. Das Akzeptorvolumen wurde auf 1000 ml erhöht, um die Vergleichbarkeit mit anderen Apparaturen zu gewährleisten. Anstelle des Pertinax-Zylinders wurde ein 1000 ml Becherglas mit einem Durchmesser von 10,5 cm und einer Höhe von 14 cm eingesetzt.

3.3.4 Apparatur IV

Die Durchflußzelle entsprach in ihren Innenabmessungen der von Langenbucher (5) vorgeschlagenen "standardisierten Durchflußzelle" (Abb. 2.6). Die Suppositorien wurden, wie von Rosemann (44) vorgeschlagen, zwischen Glaskugeln von 1 mm Durchmesser gebettet. Die Zellen wurden umgedreht und von oben nach unten mit Akzeptormedium durchströmt, um zu verhindern, daß geschmolzene Suppositorienmasse aus der Freisetzungszelle ausgeschwemmt wurde. Eine Schlauchpumpe pumpte das Akzeptormedium mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min durch die Zelle. Das Gesamtvolumen der leeren Zelle betrug 16 cm . Durch das Auffüllen mit Glaskugeln wurde das Totvolumen auf 5,8 cm reduziert.

3.3.5 Apparatur V

Tukker (8), (Abb. 2.7) stellte ein Membranmodell vor mit dem sich die durch Druckänderungen im Akzeptormedium die Darmperistaltik simulieren läßt.
Die Geschwindigkeit wurde von 1500 ml/min auf 1000 ml/min reduziert. In einem 200 Liter Wasserbad wurden gleichzeitig die Apparatur und das Vorratsgefäß mit der Akzeptorflüssigkeit temperiert. Die Temperatur des Wasserbades und der Apparatur betrug 37 °C ± 0,2 °C.
Als Membran wurde ein Zellulose-Schlauch (Visking 20/32) eingesetzt. Der mittlere Porenradius beträgt 24 Angström (85). Vor Versuchsbeginn wurde der Schlauch 12 Stunden gewässert. In einem Vorversuch wurde der Zellulose-Schlauch mit 5 ml 10%iger Natriumbenzoatlösung gefüllt und in die Apparatur eingespannt. Nach fünf Minuten hatte sich auf beiden Seiten der Membran die gleiche Konzentration eingestellt. Die Permeationshalbwertszeit liegt somit unter einer Minute. Durch die Zeitspanne, die benötigt wurde, um den Membranschlauch in die Halterung einzubauen und die Apparatur zu verschließen, ist eine bessere zeitliche Auflösung der Einstel-

lung des Konzentrationsgleichgewichtes nicht möglich. Bei den Freisetzungsuntersuchungen stellte sich das Konzentrationsgleichgewicht so schnell ein, daß die Membranpermeabilität keinen feststellbaren Einfluß auf die Ergebnisse hatte.

3.3.6 Akzeptormedium

In allen Versuchen wurde frisch hergestellter Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet (0,067 molar).

7,5g KH_2PO_4 + 69,7g Na_2HPO_4 $2H_2O$ / 10 Ltr

Der pH-Wert wurde potentiometrisch gegen den entsprechenden NBS-Standardpuffer geprüft.

3.4 Elektronische Speicherung und Verarbeitung der Daten

Zur Speicherung und Verarbeitung der Daten wurde ein Rechner des Typs Digital PDP 11/34 mit dem Betriebssystem RSX-11M verwendet. Die zur Auswertung notwendigen Algorithmen wurden in Fortran IV umgesetzt. Die Programme sind auf Anfrage erhältlich.

4 Versuchsdurchführung

4.1 In vitro-Versuche

4.1.1 Rührgefäßmethoden

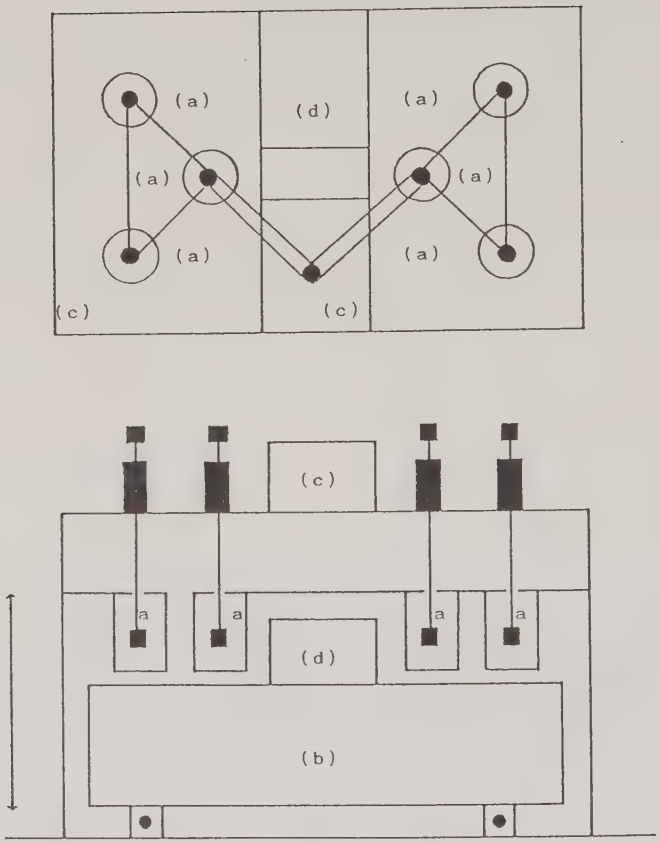
Für die Freisetzungversuche aus den Apparaturen I, II und III wurde ein Sechsfachrührer (Abb. 4.1) gebaut. Die Rührgefäße wurden mit starken Gummibändern in einem Metallrahmen befestigt und die Rührer

in Bohrfutter eingespannt. Die Rührschäfte bestehen aus 7 mm Edelstahlstäben und wurden vor Versuchsbeginn zentriert. Sechs Rührer wurden über Zahnkeilriemen von einem gemeinsamen Motor angetrieben. Während des gesamten Versuchszeitraum wurde die Umdrehungszahl überwacht. Die Schwankungen lagen unter einer Umdrehung pro Minute. Das Wasserbad, in dem die Apparaturen temperiert wurden, ließ sich absenken. Die Temperatur wurde über einen Thermostaten (Lauda, MGW) konstant gehalten, der mit ein Kontaktthermometer und einen Intervallgeber (Lauda, MGW, R2 electronic) geregelt wurde. Durch eine zusätzliche Isolation des Wasserbades mit Schaumstoff war die Temperatur auf 37 ^{o}C mit einer Genauigkeit von ±0.2 ^{o}C einstellbar. Vorversuche an der Apparatur IV hatten ergeben, daß Schwankungen in der Temperatur um 2^{o}C einen deutlich höheren Einfluß auf die Freisgaetzungsgeschwindigkeit hatten, als eine Verdoppelung der Durchströmungsrate.

Zwischen Wasserbad und Apparaturen bestehen keine festen Verbindungen. Dadurch konnte die Übertragung von Vibrationen vom Wasserbad auf die Freisetzungsgeräte gesenkt werden.

Bei den Apparaturen I und II konnten die sechs temperierten Rührgefäße innerhalb einer Minute mit den Suppositorien beschickt werden. Bei der Apparatur III mußten die temperierten Apparaturen erst geöffnet werden, um die Testsuppositorien unter der Glasplatte befestigen zu können. Das Einbringen der Suppositorien nahm ca. drei Minuten in Anspruch.

Die Probenziehung erfolgte automatisch. Über eine programmierbare Zeitschaltuhr wurde eine Pumpe gesteuert, die gleichzeitig aus allen sechs Apparaturen 5 ml Probenflüssigkeit absaugte. Danach wurden die Probenschläuche mit 5 ml frischem Akzeptormedium gespült und das Akzeptorvolumen der Apparaturen auf seinen ursprünglichen Stand aufgefüllt.



(a) Freisetzungsapparatur
(b) Wasserbad
(c) Motor
(d) Thermostat

Abb.4.1 6-fach-Rührer

4.1.2 Apparatur IV

Vier Durchflußzellen wurden bei Raumtemperatur gleichzeitig mit Suppositorien beschickt. Vor dem Versuchsbeginn wurden Wasserbad und Akzeptormedium auf 37 °C ±0,2 °C erhitzt. Die Schläuche zur Pumpe und zum Probenablauf wurden angeschlossen. Danach wurden die Zellen und die Schlauchverbindungen in das Wasserbad getaucht und die Pumpe eingeschaltet (5ml±0,5/min). Die Totzeit bis zum Erscheinen des Akzeptormediums am Fraktionsammler betrug ca. 3 Minuten.
Das aus den Durchflußzellen ablaufende Akzeptormedium wurde in festgelegten Zeitabständen gesammelt (Anhang A). Nach Versuchsende wurde das Volumen der verbrauchten Akzeptorflüssigkeit bestimmt, um die durchschnittliche Durchflußgeschwindigkeit zu erfassen.

4.1.3 Apparatur V

In einen 20 cm langen Zellulose-Schlauch wurden bei Raumtemperatur 10 ml Phosphatpuffer pH 7.0 zusammen mit dem Zäpfchen eingeführt. Die Apparatur wurde möglichst schnell verschlossen und in ein Wasserbad gesenkt. Zum wasserdichten Zusammenbau der Apparatur benötigte man mindestens 5 Minuten, während dieser Zeit war das Suppositorium bereits von 10 ml Akzeptormedium umspült. Die Versuchszeit begann mit dem Einschalten der Pumpe. Das Akzeptorvolumen betrug 2000 ml und wurde im geschlossenen System umgewälzt. Entsprechend den Angaben des Autors (8) wurde am Ausfluß der Freisetzungszelle eine Klemme angebracht. Sie wurde so eingestellt, daß die Wassersäule in einem vorgeschalteten Steigrohr auf eine Höhe von 40 cm anstieg. Nach 20 Sekunden wurde die Pumpe durch eine Kurzzeitschaltuhr ausgeschaltet. Das Niveau des Akzeptormediums fiel bis auf die Höhe des Suppositoriums, danach wurde die Pumpe wiederum für 20 Sekunden eingeschaltet. Dadurch soll die Darmperistaltik simuliert werden. Die Proben wurden zu festgelegten Zeiten mit einer Schlauchpumpe aus dem Akzeptorvorratsgefäß abgesaugt und auf einen Probensammler gegeben. Die Probenziehung wurde durch die programmierbare Zeitschaltuhr weitgehend automatisiert.

4.1.4 Gehaltsbestimmung

Die Proben wurden spektralphotometrisch (Beckmann Spektralphotometer DB mit Quarzküvetten, Hellma 100 Qs) untersucht. Für Benzoesäure wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen (0,1mg Benzoesäure/100ml 0,1N-HCl). Bei den Absorptionsmaxima (270 nm, 234 nm) wurden die Eichkurven für das Photometer erstellt. Damit standen zwei unterschiedlich empfindliche Meßbereiche zur Verfügung. Die Proben aus den Freisetzungsapparaturen wurden in 0,1 N-HCl vermessen (Tabelle 4.1).

aus den Eichreihen berechnet:		
gemessen bei nm	270	234
spez. Ext. Koeffizient	81.26	922.24
Literaturwerte (86):		
gemessen bei nm	273	230
spez Ext.-Koeffizient	81.0	929.0

Tabelle: 4.1 Spezifische Extinktion von Benzoesäure in 0,1N-HCl.

4.2 In vivo-Versuche

4.2.1 Vorbereitung der in vivo-Versuche

Die Versuche wurden an fünf freiwilligen, gesunden Probanden durchgeführt.

Proband	Alter Jahre	Gewicht Kg	Körpergröße cm	Geschlecht
A.	27	64	174	weiblich
B.	27	68	185	männlich
C.	27	59	177	weiblich
D.	42	74	178	männlich
E.	27	74	176	männlich

Tabelle 4.2 Gewicht, Alter, Körpergröße und Geschlecht der Probanden

Vor den Hauptversuchen wurde in Vorversuchen die Höhe und der zeitliche Verlauf des endogenen Hippursäurespiegels und der Einfluß der Nahrung auf die Hippursäureausscheidung im Harn untersucht.

4.2.2 Anordnung der in vivo-Versuche

Die Versuche wurden so angelegt, daß von jedem Testsuppositorium in vivo 6 Konzentrations-Zeit-Kurven erhalten wurden. Um die Belästigung der freiwilligen Probanden auf ein erträgliches Maß zu reduzieren, wurden Wiederholungsversuche nur an einem Probanden durchgeführt. An jedem Probanden wurde die Urinausscheidung nach Gabe eines Klysmas untersucht, um die in vivo-Auflösungskurven individuell für jeden Probanden bestimmen zu können. Die Versuchsanord-

nung ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben. Die Nummer hinter der Bezeichnung des Probanden gibt die zeitliche Reihenfolge an, in der die Versuche durchgeführt wurden. Bei fehlender Nummer wurde der Versuch vorzeitig abgebrochen und nicht ausgewertet.

Klysma	Suppositorium NH15	Suppositorium BH15	Suppositorium NW35	Suppositorium BW35
E. 1	E. 2	E. 4	E. 3	E. 5
E. 8	E. 14	E. 9	E. 10	E. 15
E. 19	C. 28	A. 11	A. 16	D. 22
D. 24	D. 30	D. 13	D. 18	B. 23
B. 25	E. 34	E. 29	B. 21	E. 26
C. 32	A. 35	C. 31	E. 34	A. 27
A. 33				

Tabelle: 4.3 Versuchsplan der in vivo-Untersuchungen

4.2.3 Durchführung der in vivo-Versuche

Die letzte Nahrungsaufnahme erfolgte am Vorabend des Versuchtages gegen 18 Uhr. Mineralwasser durfte ohne mengenmäßige Beschränkung getrunken werden.

Am Versuchstag wurden ab acht Uhr Urinproben in viertelstündigen Abständen gesammelt. Nach jeder Entleerung wurden 200 ml Wasser getrunken. Die ersten vier Urinproben dienten der Bestimmung des individuellen endogenen Hippursäureausscheidung. Eine Stunde nach Beginn der Probenziehung wurden die Klysmen oder Suppositorien appliziert. Weitere zwei Stunden lang wurden alle 15 Minuten und später in halbstündigen Intervallen Urinproben gesammelt. Das Volumen der Probe wurde mit 500 ml Meßzylindern gemessen und protokolliert. Die gesamte Versuchsdauer betrug mindestens sechs Stunden (Anhang B). Versuche, die durch vorzeitigen Stuhlgang des Probanden beendet wurden, konnten nicht ausgewertet werden. Die Bewegungsfreiheit der Probanden wurde nicht eingeschränkt.

Eine gelegentlich beobachtete unangenehme Reizwirkung nach der Applikation von Benzoesäure oder Natriumbenzoat hatte keinen Einfluß auf die Versuchsdauer.

4.2.4 Analytik

5 ml Urin wurden entsprechend der Vorschrifft von Moolenaar (74) mit 5 ml konzentrierter Salzsäure in Glasampullen abgefüllt und zugeschmolzen. Die Proben wurden 12 Stunden auf 100 °C erhitzt. Dabei wird die Hippursäure zu Glycin und Benzoesäure gespalten. Nach dem Abkühlen und Öffnen der Ampulle wurde 1 ml der Lösung mit 15 ml Tetrachlorkchlenwasserstoff extrahiert. Danach wurden 5 ml der organischen Lösung mit 5%iger Natriumdihydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. 3 ml der Lösung wurden 1.0 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt. Die Proben wurden nach Ende der Gasentwicklung photometrisch bei 231 nm vermessen (Kap. 3.5). Die untere Erfassungsgrenze liegt bei 25 µg/ml. Der Variationskoeffizient bei wiederholter Aufarbeitung und Vermessung war kleiner als 5%.

5 Ergebnisse

5.1 In vitro-Freisetzungsverläufe

In den Freisetzungsmodellen wurden von jeder Suppositoriencharge sechs Wiederholungsversuche durchgeführt. Die Wirkstoffliberation wurde über 390 Minuten beobachtet. Danach wurde der Versuch abgebrochen. Aus apparativen Gründen konnte die Analytik der Proben erst nach Versuchsende durchgeführt werden. Zur Zeit des Versuchsabbruchs war das Ausmaß der Freisetzung noch nicht bekannt. Eine längere Beobachtungszeit wäre nur durch Automatisierung möglich.
Die Freisetzungsverläufe sind im Anhang A dokumentiert. Aus den kumulativen Konzentrationsverläufen, die mit Apparatur I, II, III und V erhalten wurden , wurde die entsprechenden Geschwindigkeits-Zeit-Verläufe berechnet (siehe Kapitel 2.4.). In Anhang A sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen aus sechs Parallelversuchen angegeben. Diese Darstellung der Daten soll nur einen Eindruck von der Freisetzungsgeschwindigkeit und den beobachteten Streuungen vermitteln. Alle folgenden Auswertungschritte wurden mit nicht gemittelten Kurvenverläufen durchgeführt.

5.2 In vivo- Konzentrations-Zeit-Verläufe

5.2.1 Ausmaß der Urinausscheidung

Oral bzw. rektal verabreichte Benzoesäure wird als Glycinkonjugat (Hippursäure) renal ausgeschieden (74,76). Daneben tritt noch freie Benzoesäure in Spuren auf. Die renale Ausscheidung ist vollständig. Dies ist der einzige Eliminationsweg, andere Metaboliten sind sind bekannt.
In den hier durchgeführten Versuchen waren die Dosisanteile, die im Urin nach Gabe der Testarzneiformen wiedergefunden wurden, unter-

schiedlich groß. Nach der Applikation von Suppositorien, die mit der Grundlage Witepsol H15 hergestellt wurden, wurde im Urin die eingesetzte Menge Benzoesäure bzw. NatriumbBenzoat wiedergefunden. Im beobachteten Versuchszeitraum sind die Freisetzungs-, Resorptions- und Eliminationsvorgänge vollständig abgelaufen.
Nach Gabe eines Klysmas wurde bei einigen Probanden weniger Benzoesäure eliminiert als bei Suppositorien auf der Grundlage von Witepsol H15. Diese Schwankungen liegen im Rahmen der allgemeinen Versuchsstreuung, könnten in einigen Fällen aber auch auf einen Wirkstoffverlustes bei der Applikation zurück zu führen sein. Deutlich schlechter war die Wiederauffindungsrate bei der Anwendung von Suppositorien auf der Basis von Witepsol W35. Von einigen Ausnahmen abgesehen wurden weniger als zwei Drittel der eingesetzten Masse Testsubstanz wiedergefunden. Die Urinausscheidungs-Geschwindigkeitskurven zeigten einen abgeschlossenen Konzentrations-Zeit-Verlauf. Die Freisetzung aus diesen Suppositorien ist unvollständig bzw. so gering, daß sie sich nicht mehr von den Schwankungen der Ausscheidungsgeschwindigkeit des endogenen Hippursäurespiegel(ca. 0.1 mg/min) trennen läßt.

5.2.2 Urinausscheidungs-Geschwindigkeiten

Die Exkretionsraten sind für die einzelnen Probanden im Anhang B wiedergegeben. Die Ausscheidungsrate der endogen gebildeten Hippursäure wurde für jeden Probanden individuell ermittelt (Kap. 4.2.3) und von den beobachteten Konzentrationen abgezogen. Die Ausscheidungsgeschwindigkeiten von Benzoesäure im Urin des Probanden A sind in den Abbildungen 5.1 - 5.3 exemplarisch dargestellt. Die Geschwindigkeit ist in % der eingesetzten Dosis pro Minute angegeben.

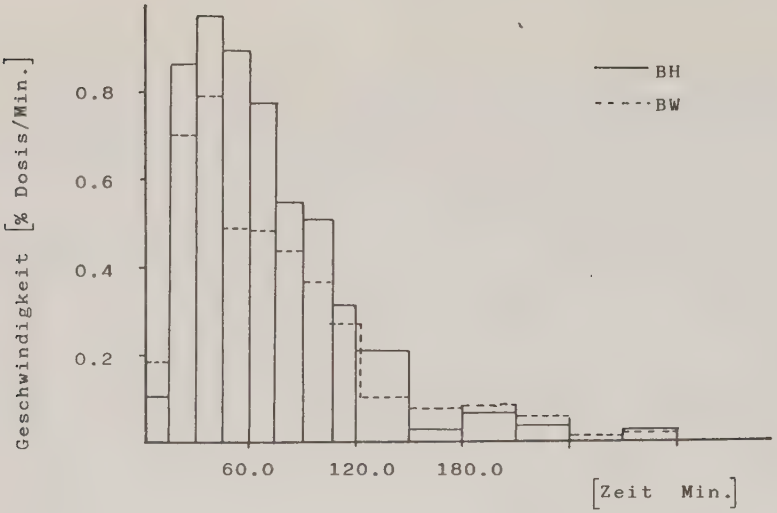


Abb. 5.2 Proband A BH, BW
mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Gesamtbenzoesäure nach Applikation der Suppositorien

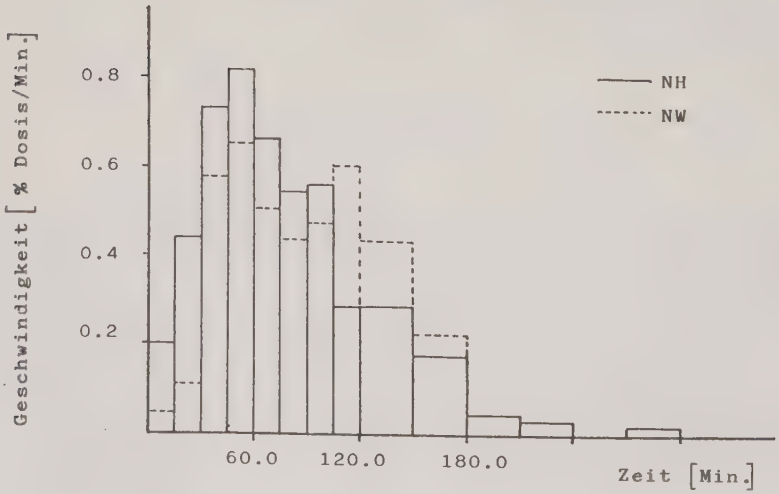


Abb. 5.1 Proband A NH, NW
mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Gesamtbenzoesäure nach Applikation der Suppositorien

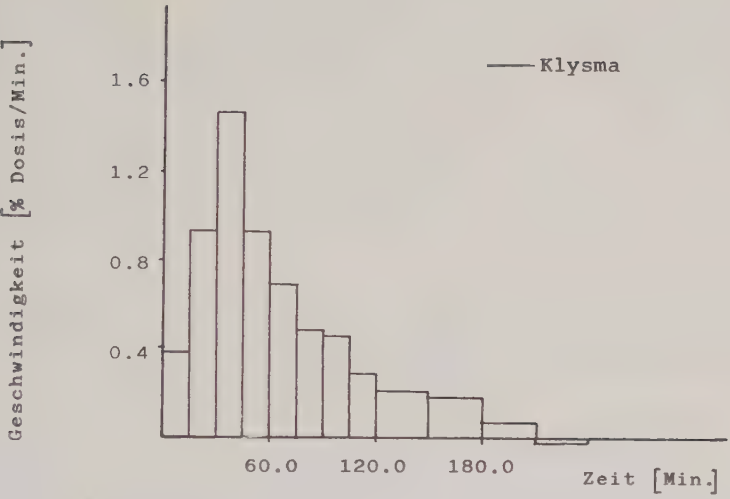


Abb. 5.3 Proband A
mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Gesamtbenzoesäure nach der Applikation eines Klysmas

5.2.3 Resorption nach Gabe eines Klysmas

Aus dem Verlauf der Hippursäureausscheidung nach rektaler Applikation einer Natriumbenzoat-Lösung, können der rektale Resorptionverlauf und die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante von Benzoesäure bestimmt werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Rekonstruktion der Freisetzungsverläufe nach Gabe der Suppositorien ist, daß die Resorption von Benzoesäure nach einem Vorgang erster Ordnung erfolgt (Kap. 2.3).
Um diese Voraussetzungen zu überprüfen, wurden den sechs Urinausscheidungskurven nach Gabe der Klysmen verschiedene Modellvorstellungen unterlegt.

A) 1-Kompartimentmodell mit Resorption 1.Ordnung
B) 2-Kompartimentmodell mit Resorption 1.Ordnung
C) 1-Kompartimentmodell mit Resorption 0.Ordnung

Eine graphische Residuenanalyse gab keine Hinweise darauf, daß die Modellvorstellungen B und C der Annahme eines einfachen 1-Kompartimentmodells mit Resorption 1.Ordnung überlegen wären. Moolenaar (74) paßte den Plamaspiegeln nach i.v.- Gabe von Benzoesäure 3- und 4-Kompartimentmodelle an. Aus einer rektal gegeben Lösung wird der Wirkstoff zu langsam resorbiert, um Mehrkompartimentmodelle aus Urindaten ableiten zu können.

5.3 Rekonstruktion der in vivo-Freisetzungsverläufe

Zur Rekonstruktion der Freisetzungsverläufe wurden die in Kapitel 2.3 beschriebenen mathematischen Verfahren verwendet. Abb. 5.4-5.6 zeigen die unterschiedlichen Ergebnisse anhand eines Datensatzes (Proband A).
Die auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse lassen sich durch die jeweils zu Grunde liegenden Modellvorstellungen erklären.

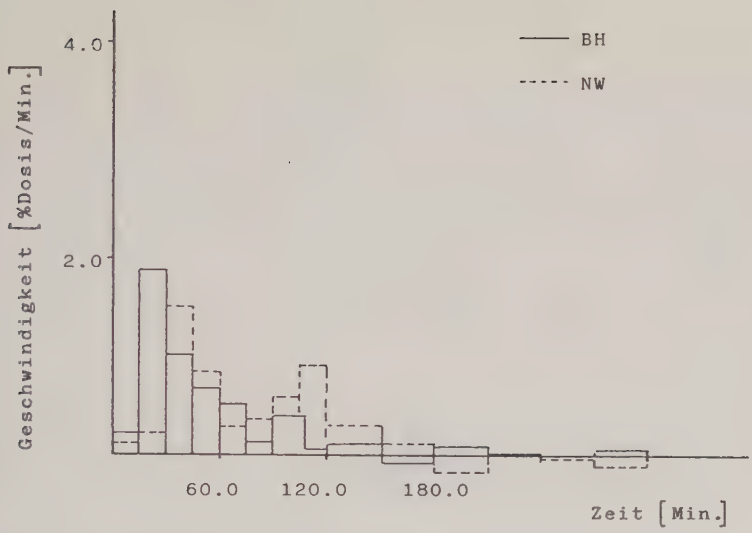


Abb. 5.4 Proband A
Wagner-Nelson Verfahren
Invasionsverlauf nach Applikation von Suppositorien

5.3.1 Rekonstruktion des Resorptionsverlaufs

Bei der Auswertung nach dem Wagner-Nelson-Verfahren (Abb. 5.4) erhält man etwas flacher verlaufende Kurven als bei den anderen Verfahren, da das Verfahren Resorptionsvorgänge erfaßt, die von der Freisetzung des Wirkstoffes bestimmt werden.
Wie in Kapitel 5.2 gezeigt wurde, beträgt die Resorptionshalbwertszeit 15 Minuten (n = 6, s = ±5 Min.). Dadurch werden die Unterschiede in den Freisetzungsgeschwindigkeiten bei den schnell freisetzenden Testsuppositorien nivelliert. Trotzdem lassen die kumulativen Resorptionsverläufe Unterschiede zwischen den einzelnen Formulierungen bei allen Probanden erkennen.

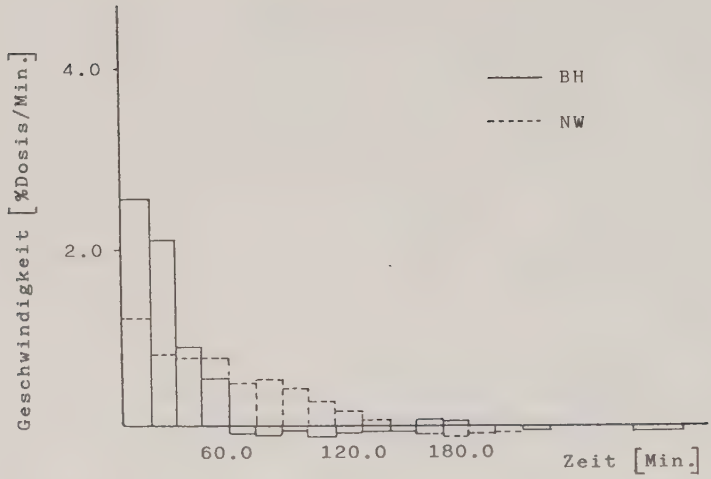


Abb. 5.5 Proband A
Numerische Dekonvolution nach Stepanek
Freisetzungsverlauf nach Applikation von
Suppositorien

5.3.2 Rekonstruktion der in vivo- Freisetzung mittels numerischer Dekonvolution

Die Dekonvolution wurde zunächst nach dem Point-Area Verfahren von Vaugham und Dennis (61) durchgeführt. Die Ergebnisse befriedigten in diesem Fall nicht. Numerische Instabilitäten erforderten eine vorhergehende Glättung der Daten.
Für jeden Probanden ist die Impulsantwortfunktion durch die Urinausscheidung nach Gabe eines Klysmas gegeben. Ein 1-Kompartimentmodell mit einer Resorption erster Ordnung wurde den Daten angepaßt. Um sie zu glätten wurden daraus für jeden Probanden die Resorp-

tions- und Eliminationskonstante bestimmt. Die Güte der Anpassung wurde über die Summe der Fehlerquadrate geschätzt. Diese Summe der Fehlerquadrate wird beeinflußt von:

- Individuellen Abweichungen des Probanden von der Modellvorstellung einer Resorption und Elimination erster Ordnung. Physiologische Faktoren, wie Darmmotilität, pH-Veränderungen an der Rektalschleimhaut, Vergrößerung der Resorptionsoberfläche oder unvollständige Blasenentleerung usw. bedingen diese Abweichungen.
- Fehler bei Volumen- und Zeitmessung, Streuung der Anaytik

Man darf davon ausgehen, daß diese Abweichungen nach Gabe der Suppositorien im selben Größenbereich liegen wie nach Gabe der Klysmen. In diesem Fall ist eine modellgebundene Glättung nicht sinnvoll, deshalb wurde eine modellfreie Glättung durch "Spline"-Polynome vorgenommen. Nach einem Verfahren von de Boor (63) kann der Grad der Glättung durch die Summe der Fehlerquadrate vorgegeben werden. Hier wurde der gleiche Wert gewählt, der bei der Kurvenanpassung an die Impulsantwortfunktion gefunden wurde. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß tatsächlich vorhandene Schwankungen des Resorptionsverlaufs fälschlich nivelliert werden. Die geglätteten Datensätze ließen sich mit dem von Stepanek vorgeschlagenen Algorithmus (62) ohne Schwierigkeiten und mit relativ geringem Rechenaufwand auswerten. Dazu mußten die Ausscheidungskurven auf gleichgroße Intervallbreiten interpoliert werden.

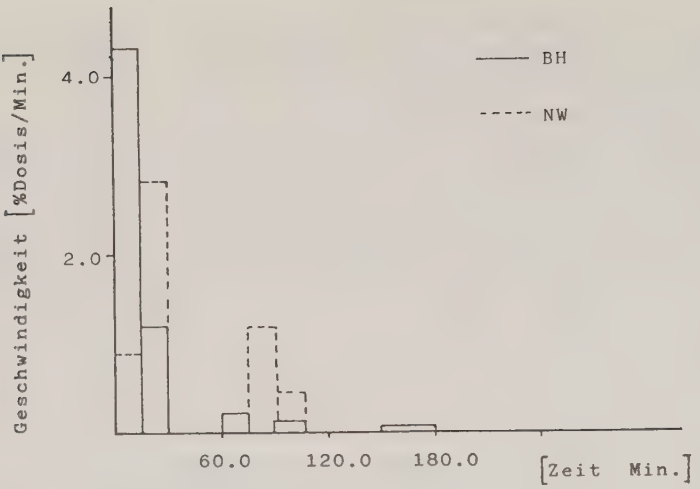


Abb. 5.6 Proband A
Kurvenanpassung
Freisetzungsverlauf nach Applikation von Suppositorien

5.3.3 Kurvenanpassung

Der Urinausscheidungsfunktion wurde ein 1-Kompartimentmodell mit Resorption und Elimination 1-ter Ordnung und einer mehrphasigen Freisetzung 0-ter Ordnung zu Grunde gelegt. Die Anzahl der Phasen entspricht der Zahl der Probenintervalle.
Die Sammelintervalle können unterschiedlich groß sein. Im Gegensatz zur numerischen Dekonvolution nach Stepanek muß keine Interpolation auf gleiche Sammelintervalle vorgenommen werden. Das Verfahren ist ohne vorherige Glättung der Daten durchführbar. Dadurch wird eine wesentliche Ursache von Fehlinterpretationen ausgeschlossen. Die Ergebnisse unterscheiden sich deshalb von den Kurvenverläufen aus

Kapitel 5.3.3. Bei der Kurvenanpasung wird für jedes Probenintervall eine positive Freisetzungsgeschwindigkeit geschätzt. Negative Freisetzungsgeschwindigkeiten, die man als Artefakte beim Wagner-Nelson Verfahren und der numerischen Dekonvolution beobachten kann, können bei der Kurvenanpassung nicht auftreten.

6 Auswertung

6.1 Methoden der statistischen Auswertung

Sowohl bei den in vivo- als auch den in vitro- Versuchen wurde jeder Versuch sechsmal durchgeführt und aus den einzelnen Experimenten die Zielgrößen für die statistischen Auswertungsverfahren bestimmt. Die Zielgrößen wurden so ausgewählt, daß die Unterschiede zwischen den Formulierungen in vivo und in vitro möglichst deutlich hervortreten (z.B. freigesetzte Dosisanteile, mittlere Verweilzeit, Varianz der Verweilzeiten). Die Auswertung erfolgte mit einem multivariaten Verfahren (mehrere Zielgrößen werden gleichzeitig berücksichtigt), bei dem Normalverteilung vorausgesetzt wird, und einem nichtparametrischen univariatem Testverfahren (nur ein Parameter wird berücksichtigt).

Die lineare Diskriminanzanalyse bietet eine erste Möglichkeit, Unterschiede anhand von ausgewählten Zielgrößen zu erkennen. Unter der Voraussetzung, daß alle Kenngrößen normal verteilt sind, die gleiche Varianz besitzen und sich nur in ihren Mittelwerten unterscheiden, lassen sich mit der Diskriminanzanalyse Unterschiede zwischen den Formulierungen aufzeigen. Dabei werden mehrere Kenngrößen zur Trennung herangezogen. Bei einigen Datensätzen zeigte sich die die Diskriminazanalyse durch die multivariate Auswertung den univariaten Methoden überlegen (Kap 6.3.4). Jedoch sind die Voraussetzungen der Diskriminanzanalyse nicht bei allen untersuchten Zielgrößen im vollen Umfang gegeben.

Da die Zielgrößen nur aus jeweils 6 Wiederholungsversuchen bestimmt wurden, sind Aussagen über die zugrunde liegenden Verteilungen nicht möglich. Deshalb wurden bei den univariaten Methoden keine Testverfahren angewendet, die normalverteilte Werte voraussetzen. Mit Hilfe der nichtparametrischen Statistik lassen sich auch nicht normalverteilte Prüfgrößen beurteilen. In den parameterfreien Testverfahren werden nicht die Zielgrößen miteinander verglichen, sondern die Verteilungen, denen die Zielgrößen angehören (87). Aus der

Zielgrößenstatistik der klassischen Verfahren entsteht eine Rangzahlstatistik .

Parameterfreie Verfahren haben den Nachteil, daß sie bei geringer Stichprobenzahl und tatsächlich vorhandener Normalverteilung der Zielgröße eine geringere Trennschärfe besitzen als klassische Prüfverfahren (z.B. t-Test, F-Test). Vorteilhaft ist die allgemeine Anwendbarkeit auf alle theoretisch möglichen stetigen Verteilungen der Parameter, ohne daß man die Verteilung kennen muß. Die Rangzahlstatistik ist unempfindlich gegen einzelne Ausreißer, da nicht die absoluten Beträge der Zielgröße, sondern nur der Rang der Beobachtung gewertet wird. In der Literatur werden für die gängigen klassischen Verfahren parameterfreie Alternativen beschrieben (87, 88, 89, 90).
Bei den in vivo-Untersuchungen stellt sich das Problem, daß die Ergebnisse mit dem Einfluß des jeweiligen Probanden verknüpft sind. Die 6 Versuchswiederholungen wurden an mehreren Probanden durchgeführt, wobei jeder Proband mindestens zwei Formulierungen und ein Klysma erhielt. Die Probanden unterscheiden sich z.B. hinsichtlich Geschlecht, Gewicht und Alter. Deshalb wurden zur Auswertung der in vivo-Untersuchungen statistische Tests für verbundene Stichproben benutzt.
Für die Auswertung der in vivo- und in vitro- Daten wurden die folgenden Verfahren benutzt.

Fragestellung	in vitro unverbundene Stichproben	in vivo verbundene Stichproben
Signifikante Lokationsunterschiede zwischen den vier Formulierungen	Kruskal-Wallis Test	Friedman-Rangsummen Test
Signifikante Lokationsunterschiede beim paarweisen Vergleich der Formulierungen	Wilcoxon-Rang Test	Wilcoxon-Vorzeichen Rangtest
Trennverfahren unter berücksichtigung mehrerer Zielgrößen	lineare Diskriminanzanalyse	

Tabelle: 6.1 verwendetete statistische Testverfahren

6.1.1 Wilcoxon-Rangtest

Der Wilcoxon- Rangtest wird in der Literatur auch als U-Test von Mann und Whitney beschrieben (89). Dabei handelt es sich um einen verteilungsfreien Lokationsvergleich zwischen zwei unabhängigen Beobachtungsreihen (p_1 , p_2). Das klassische Gegenstück wäre der t-Test. Den $n_1 + n_2$ Werten beider Meßreihe werden durchgehend Rangzahlen (R_i) vom kleinstem zum größten Wert zugeordnet. Für die einzelnen Beobachtungen einer Reihe wird dann die Summe der Rangzahlen gebildet und mit einem tabellierten Wert verglichen (88,89).

$$W = \sum_{j=1}^{n} R_i \qquad \text{Gl. 6.1}$$

Die Nullhypothese - es besteht kein Unterschied - wird angenommen

falls gilt:

$$W_{n_1,\, n_2} \leq W_{n_1,\, n_2,\, \alpha} \qquad \text{Gl. 6.2}$$

$$W_{n_1,\, n_2} \geq n_1\,(n_2 + n_1 + 1) - W_{n_1,\, n_2,\, \alpha} \qquad \text{Gl. 6.3}$$

Bei den hier durchgeführten Versuchen ist der Umfang der Meßreihen mit $n_1 = n_2 = 6$ klein, deshalb ist es schwer, einen Unterschied zum vorher festgelegten Vertrauensintervall ($\alpha = 0{,}05$) nach zu weisen. Ein Maß für den wahrscheinlichsten Wert der Lokationsunterschiede ist der Hodges-Lehmann Schätzer (88). Zwischen den Werten der beiden Beobachtungsreihen werden alle möglichen Differenzen gebildet und daraus der Median bestimmt (Hodges-Lehmann Schätzer). Dieser Schätzer ist stabiler gegen Ausreißer als das arithmetische Mittel der Differenzen. Für den Schätzer lassen sich parameterfreie Konfidenzintervalle angeben (88).

6.1.2 Wilcoxon-Vorzeichenrangtest

Für den Wilcoxon-Vorzeichenrangtest werden zunächst für jeden Probanden die Differenzen zwischen den Zielgrößen gebildet (Z_i), die nach Gabe der Formulierungen bebachtet wurden , und den Differenzen Rangzahlen (R_i) zugeordnet. Danach wird die Summe der positiven Rangzahlen gebildet (T^+).

$$T^+ = \sum_{i=1}^{n} c_i\, R_i \qquad c = \begin{cases} 0, \text{ falls } R_i < 0 \\ 1, \text{ falls } R_i > 0 \end{cases} \qquad \text{Gl. 6.4}$$

Dem Verfahren liegt folgendes Modell zugunde:

$$Z_i = \theta + e_i \qquad \text{Gl. 6.5}$$

Die beobachtete Differenz (Z_i) setzt sich aus dem Verschiebungsparameter θ und einem unabhängigen Zufallsfehler e_i zusammen. In einem

zweiseitigen Test wird dann die Nullhypothese, daß Z nicht von Null verschieden ist verworfen, falls gilt:

$$T^+ \quad W_{n,\ 1-\alpha/2} \quad \text{oder} \quad T^+ \quad W_{n,\ \alpha/2} \qquad \text{Gl. 6.6}$$

Die kritischen Werte von $W_{n,\alpha}$ sind bei (88) tabelliert. Als parameterfreier Schätzer für die Differenz zwischen den Behandlungen θ dient der Median der Walsh-Mittel $\hat{\theta}$. Die $I(I+1)/2$ Walsh-Mittel berechnen sich nach (88,89).

$$(z_i + z_j)/2 \ ; \ i \leq j = 1,2,3\ldots i \qquad \text{Gl. 6.7}$$

Der Median der Walsh-Mittel (Hodge-Lehmann) ergibt sich aus (88):

$$0 = \text{Median} \left[(z_i + z_j)/2 \ ; \ i \leq j = 1,2,3\ldots i\right] \qquad \text{Gl. 6.8}$$

Für diesen Schätzer lassen sich ebenfalls parameterfreie Konfidenzintervalle angeben (88).

6.1.3 Test nach Kruskal und Wallis

Dieser Test entspricht einer einfachen Varianzanalyse. Geprüft wird, ob ein Unterschied zwischen zwei Beobachtungsreihen besteht oder ob die Schwankungen innerhalb der Beobachtungen größer sind als die Unterschiede zwischen den Beobachtungsreihen. Den N-Meßwerten aller Beobachtungsreihen (p_i) werden der Größe nach Rangzahlen (R_i) zugeordnet. Für jede Beobachtungsreihe wird die Summe der zugehörigen Ränge ($R_{i.}$) gebildet und daraus die Prüfgröße (H) gebildet.

$$H = \frac{1}{B}\left[\frac{12}{n\ (n+1)} \sum_{i=1}^{p_i} \frac{1}{n_i} R_{i.}^{\ 2} - 3\ (n+1)\right] \qquad \text{Gl. 9.6}$$

H wird mit einem tabellierten Wert verglichen (89) und die Nullhypothese - es besteht kein Unterschied zwischen den Beobachtungen - dementsprechend entweder angenommen oder abgelehnt.
Besteht ein Unterschied zwischen den Beobachtungen , dann ist über die Rangsummen auch ein multipler Vergleich möglich, zwischen welchen Meßreihen besonders deutliche Unterschiede bestehen.

6.1.4 Friedman-Rangsummentest

Der Friedman-Rangsummentest dient ebenso wie der Wilcoxon-Rangsummentest der Beurteilung verbundener Stichproben. Beim Friedman-Rangsummentest werden mehr als zwei Beobachtungsreihen auf Unterschiede überprüft. Der Test entspricht einer zweifachen Varianzanalyse.
Den Ergebnissen eines Blockes (p_i), (ein Proband, an dem mehrere Formulierungen erprobt wurden, bildet z.B. einen Block) werden Rangzahlen (R_j) zugeordnet. Die Rangzahlen werden dann für die einzelnen Zubereitungen addiert ($R_{j.}$) und daraus die Prüfgröße H gebildet.
Die kritischen Werte für die Entscheidung über die Nullhypothese sind in (88) tabelliert.

$$V = \frac{12}{r\ p\ (p+1)} \sum_{j=1}^{p} R_{j.}^{\ 2} - 3\ r\ (p+1) \qquad \text{Gl. 6.10}$$

Mit den Rangsummen läßt sich ebenfalls ein multipler Vergleich auf Unterschiede zwischen einzelnen Formulierungen durchführen.

6.1.5 Diskriminanzanalyse

Das Verfahren der Diskriminanzanalyse gestattet es, aus mehreren Kenngrößen ein gemeinsames Maß zu gewinnen, mit dem sich zwei oder mehr Gruppen von Beobachtungen voneinander trennen lassen (89,90). Bei der linearen Diskriminanzanalyse wird als Trennmaß eine lineare Trennformel gewählt.

$$X = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \qquad \text{Gl. 6.11}$$

Die Gleichung 6.11 entspricht einer Trennformel mit drei Kenngrößen (x_1, x_2, x_3), wobei die Konmstanten b_1, b_2, b_3 so zu bestimmen sind, daß die nach X berechneten Werte für die beobachteten Gruppen möglichst weit auseinander liegen. Der Unterschied (d_x) zwischen zwei Beobachtungen A und B läßt sich als Differenz der durchschnittlichen berechneten Werte ($\overline{X}_A$, $\overline{X}_B$) angeben.

$$d_x = \overline{X}_A - \overline{X}_B \qquad \text{Gl. 6.12}$$

Außerdem sollen die Konstanten b_1, b_2 und b_3 so gewählt werden, daß die Streuung (T) der berechneten Werte innerhalb einer Beobachtungsreihe möglichst klein wird.

$$T = \sum (X_A - \overline{X}_A)^2 + (X_B - \overline{X}_B)^2 \qquad \text{Gl. 6.13}$$

Zusammengefaßt ergibt sich daraus, daß der Quotient d_x^2/T möglichst groß werden soll. Durch Differentiation und Nullsetzen der Ableitung von d_x^2/T nach b_1, b_2, b_3 erhält man für die eingesetzten Werte der Beobachtungen A und b ein System von Gleichungen. Aus der Lösung dieser Gleichungen (87,90) ergeben sich dann die Konstanten b_1, b_2 und b_3 der Trennformel (Gl. 6.11). Die Prüfung, ob eine ermittelte lineare Diskriminanzfunktion eine wirkliche Trennung der Beobachtungen bewirkt hat, kann über die Varianzanalyse erfolgen (87).

6.2 Auswertung der in vitro-Versuche

Die Freigabegeschwindigkeiten werden für jede Apparatur innerhalb der Sammelintervalle gemittelt (Anhang A). Die folgenden statistischen Auswertungen wurden mit den einzelnen, nicht gemittelten Geschwindigkeitskurven durchgeführt.
Aus den einzelnen Kurvenverläufen wurden jeweils drei Zielgrößen berechnet. Diese Kenngrößen entsprechen dem nullten gewöhnlichen Moment, dem ersten gewöhnlichem Moment und dem zweiten zentralen Moment der Verweilzeitverteilung (Kap. 2.3.1). Die nach Versuchsende (390 Minuten) freigesetzte Menge Testsubstanz (M_{390}) in Prozent, bezogen auf die im Suppositorium enthaltene Menge (erste gewöhnliche Moment) entspricht nicht immer der eingesetzten Dosis. In Abhängigkeit von der verwendeten Apparatur und Formulierung werden unvollständige Freisetzungsverläufe beobachtet.
Um einen Vergleich zwischen den Apparaturen und den Formulierungen auch mit dem ersten gewöhnlichen und zweiten zentralen Momenten durchführen zu können, wurden die Freisetzungsverläufe bis zur Freisetzung von 80% der eingesetzten Dosis verfolgt. Daraus wurden die mittlere Verweilzeit ($\bar{t}_{80\%}$) und die Varianz der Verweilzeiten ($Var_{t80\%}$)berechnet.
Mit diesen Zielgrößen sollen folgende Fragen beantwortet werden.

- Ist eine Apparatur in der Lage, Unterschiede zwischen den Formulierungen zu finden (Differenzierungsvermögen)?
- Wie groß sind die Streuungen zwischen wiederholten Versuchen (Reproduzierbarkeit)? Dabei lassen sich Unterschiede zwischen den Suppositorien einer Charge nicht von der Variabilität der Versuchsbedingungen trennen .
- Ist die Variabilität der Parameter innerhalb einer Formulierung größer als die zwischen unterschiedlichen Formulierungen?
- Welche Formulierungen lassen sich mit welcher Apparatur besonders deutlich unterscheiden?

Die Mittelwerte der Zielgrößen aus den sechs Wiederholungsversuchen sind mit ihren Standardabweichungen in Anhang A angegeben.

6.2.1 Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen der in vitro-Freisetzungsapparaturen

Die untersuchten Apparaturen sollten bei wiederholten Versuchen mit derselben Formulierung möglichst wenig streuende Ergebnisse liefern (Reproduzierbarkeit). Bei der Untersuchung unterschiedlicher Formulierungen sollten vorhandene Differenzen in den Zielgrößen möglichst deutlich hervor treten (Differenzierungsvermögen). Die Größe Differenzierungsvermögen läßt sich nicht unabhängig von der Reproduzierbarkeit beschreiben. Unterschiede zwischen verschiedenen Formulierungen können sowohl Apparaturen mit einer geringen Reproduzierbarkeit und einem hohen Differenzierungsvermögen, als auch Apparaturen mit hoher Reproduzierbarkeit und geringem Differenzierungsvermögen aufzeigen.
Zur Bewertung von Reproduzierbarkeit und Differenzierungsfähigkeit einer Apparatur wird folgendes varianzanalytische Modell herangezogen:

$$s^2_{(tot)} = s^2_{(rep)} + s^2_{(dif)}$$

Die Gesamtvariation der beobachteten Zielgröße (s^2_{tot}) setzt sich zusammen aus der Variation innerhalb der Wiederholungsversuche (Reproduzierbarkeit; s^2_{rep}) und der Variation zwischen den Formulierungen (Differenzierungsvermögen; s^2_{dif}). Eine Apparatur erlaubt die Unterscheidung von Formulierungen, wenn die Streuung innerhalb der Wiederholungsversuche deutlich kleiner ist als die Streuung zwischen den verschiedenen Formulierungen. Der Kruskal-Wallis-Test quantifiziert diesen Unterschied durch die Prüfgröße H (Kap. 6.1.3). Da alle Versuche nach dem gleichen Plan durchgeführt wurden, lassen sich die aus verschiedenen Apparaturen erhaltenen Prüfgrößen direkt miteinander vergleichen. Anhand der Prüfgröße H läßt sich die Trennleistung einer Apparatur quantifizieren. Beim vorliegenden Probenumfang ist die Streuung zwischen den untersuchten Formulierungen signifikant größer als die Streuung innerhalb der Wiederholungsversuche, wenn $H > 9{,}48$ ($\alpha = 0{,}05$). Abbildung 6.1 zeigt die Prüfgrößen H für verschiedene Apparaturen und Zielgrößen.

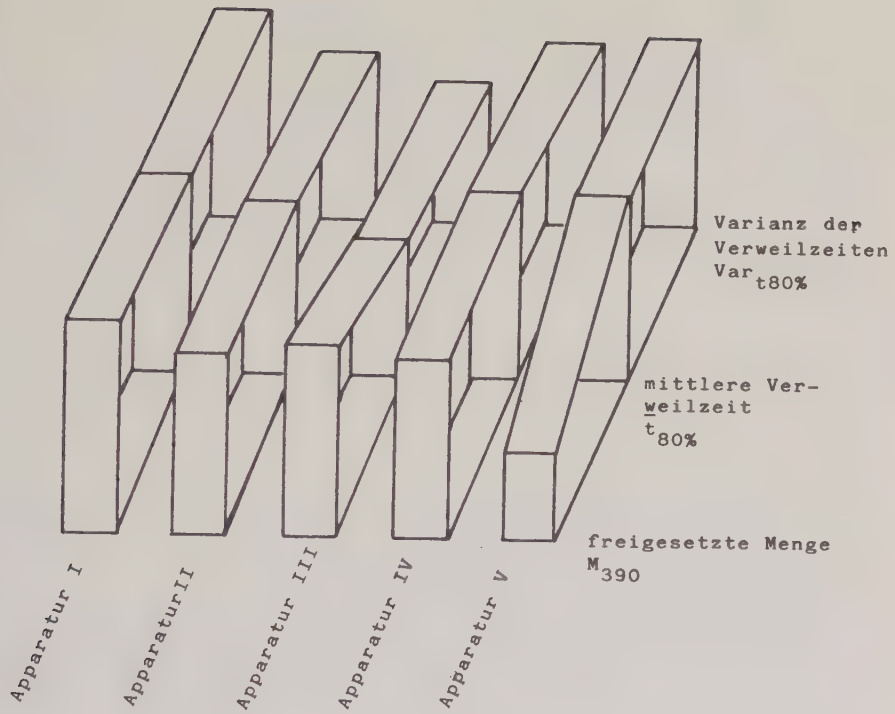


Abb. 6.1 Prüfgröße H in Abhängigkeit von der verwendeten Apparatur und der untersuchten Zielgröße

untersuchter Parameter / Apparatur	freigesetzter Dosisanteil	mittlere Verweilzeit	Varianz der Verweilzeiten
Apparatur I	19,86	19,44	19,61
Apparatur II	17,02	16,74	15,71
Apparatur III	18,09	13,28	13,38
Apparatur IV	16,60	18,36	17,21
Apparatur V	8,13	17,59	17,84

Tabelle 6.2 Prüfgröße H des Kruskal-Wallis-Tests in Abhängigkeit von der verwendeten Apparatur und der untersuchten Zielgröße.

Die besten Trennleistung zeigen für die untersuchten Zielgrößen die Apparaturen I und IV. Bei der Apparaturen V zeigt die Prüfgröße H für den nach 390 Minuten freigesetzten Dosisanteil geringe Unterschiede zwischen den Formulierungen auf.
In den Kapiteln 6.2.2 - 6.2.5 wird gezeigt, daß in Abhängigkeit von den der verwendeten Apparatur verschiedene Eigenschaften der Formulierungen unterschiedlich deutlich hervor treten. Eine Wertung, welche Apparatur eine den in-vivo Verhältnissen entsprechende Reihenfolge der Zielgrößen aufzeigt erfolgt im Rahmen der in vivo- in vitro- Korrelation (Kap.7).

6.2.2 Apparatur I

Die Testsuppositorien zeigten in der Apparatur I langsamere Freisetzungsverläufe als in den anderen Apparaturen. Die Streuung der untersuchten Größen (M_{390}, $t_{80\%}$, $Var_{t80\%}$) ist größer als bei den anderen Apparaturen (Anhang A). Die von Cox (3) vorgestellte Apparatur ermöglicht eine deutliche Unterscheidung zwischen den Suppo-

sitorien für die bis Versuchsende freigesetzte Menge Testsubstanz, die mittlere Verweilzeit und die Varianz der Verweilzeiten (Kruskal-Wallis-Test, α =0,05). Ein multipler Vergleich (Kap. 6.3.1) zeigt bei allen Prüfgrößen einen signifikanten Unterschied zwischen den Suppositoriengrundlagen (α =0,05). Aus Witepsol H15 wird im Versuchszeitraum mehr Benzoesäure bzw. Natriumbenzoat freigesetzt als aus Witepsol W35. Auch die mittlere Verweilzeit und die Varianz der Verweil-zeiten sind geringer als bei Witepsol W35.
Die paarweisen Vergleiche für je zwei Formulierungen zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Suppositoriengrundlagen (Wilcoxon- Vorzeichenrangtest). Nach Hodges-Lehmann (88) beträgt der mittlere Unterschied für den nach Versuchsende freigesetzten Dosianteil 40% zwischen Benzoesäure in Witepsol H15 und Natriumbenzoat in Witepsol W35. In der Grundlage Witepsol H15 lassen sich im paarweisen Vergleich für alle drei Parameter signifikante Unterschiede zwischen Benzoesäure und Natriumbenzoat nachweisen. Die Hodges-Lehmann-Schätzer und die zugehörigen Konfidenzintervalle deuten darauf hin, daß diese Unterschiede weit geringer sind als diejenigen, die durch den den Unterschied zwischen den Suppositoriengrundlagen verursacht werden. Die Freisetzungsverläufe zwischen Natriumbenzoat und Benzoesäure aus Witepsol W35 sind sich so ähnlich, daß keine der untersuchten Kenngrößen signifikante Unterschiede aufweist. Die 95% Konfidenzintervalle beinhalten sowohl positive als auch negative Werte für die Differenzen aus den Formulierungen.
Das gute Differenzierungsvermögen der Apparatur I in Bezug auf den nach 390 Minuten freigesetzten Dosisanteil beinhaltet, daß nicht von allen Formulierungen vollständige Freisetzungskurven erhalten wurden. Die Freisetzung reicht von 80% bei Benzoesäure aus Witepsol H15 bis zu 41% bei Natriumbenzoat aus Witepsol W35 (Anhang A). Damit läßt sich in vitro der Freisetzungsverlauf von Natriumbenzoat aus Witepsol W35 nur für weniger als die Hälfte der eingesetzten Substanz erfassen. Die Schätzung der anderen Parameter (mittlere Verweilzeit und Varianz der Verweilzeit) läßt sich für NW35 nur durch Extrapolation der Freisetzungsverläufe erreichen.

Tabelle 6.3 Apparatur I

Prüfgröße: % freigesetzter Dosisanteil nach 390 Minuten M_{390} [%]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	19,6	11,8 - 28,7
BH15:BW35	s	46,1	42,5 - 56,2
BH15:NW35	s	40,5	37,0 - 47,5
NH15:BW35	s	28,5	15,4 - 40,5
NH15:NW35	s	22,7	10,1 - 31,7
BW35:NW35	ns	-5,8	-15,1 - 1,9

Prüfgröße: Mittlere Verweilzeit $\bar{t}_{80\%}$ [h]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	-1,63	-2,73 - -0,96
BH15:BW35	s	-6,36	-7,21 - -5,59
BH15:NW35	s	-6,32	-7,37 - -5,50
NH15:BW35	s	-4,57	-6,00 - -3,02
NH15:NW35	s	-4,68	-6,13 - -3,31
BW35:NW35	ns	-0,2	-1,62 - 1,46

Prüfgröße: Varianz der Verweilzeiten, $Var_{t80\%}$ [h^2]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	-5,2	-18,2 - -2,4
BH15:BW35	s	-43,9	-47,6 - -30,7
BH15:NW35	s	-35,8	-39,6 - -30,2
NH15:BW35	s	-33,4	-44,8 - -19,8
NH15:NW35	s	-28,5	-35,5 - -17,7
BW35:NW35	ns	7,9	-8,1 - 19,3

α = 0,05 ist nicht tabelliert

6.2.3 Apparatur II

Die modifizierte Cox Apparatur unterscheidet sich von der Apparatur I durch eine größere Agitation an der Grenzfläche zwischen Suppositorium und Akzeptormedium. Deshalb wurde im Versuchszeitraum mehr Testsubstanz freigesetzt als in Apparatur I. Bei der Apparatur II ist die mittlere Verweildauer und die Varianz der Verweildauern geringer als bei den aus der Apparatur I erhaltenen Freisetzungsverläufen. Die Variabilität der Kenngrößen ist geringer. Die Kurvenverläufe aus Apparatur II sind besser reproduzierbar als die Kurven aus Apparatur I (Anhang A).

Über den Kruskal-Wallis-Test lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Suppositorien für die drei untersuchten Zielgrößen finden (M_{390} , $\bar{t}_{80\%}$, $Var_{t80\%}$). Speziell sind die Unterschiede zwischen Natriumbenzoat in Witepsol W35 und Benzoesäure in Witepsol H15 oder Witepsol W35 signifikant (multipler Vergleich, =0,05).

Die paarweisen Vergleiche der Formulierungen ergeben ebenfalls signifikante Unterschiede, wenn eine der Formulierung mit einem Testsuppositorium aus Natriumbenzoat in Witepsol W35 verglichen wird (Wilcoxon- Rangtest). Natriumbenzoat in Witepsol W35 besitzt von allen Formulierungen die schlechtesten Freisetzungseigenschaften. Die Mediane der Differenzen (Hodges-Lehmann-Schätzer) für alle Zielgrößen zeigen, daß bei den anderen Vergleichen die Unterschiede deutlich geringer sind.

Benzoesäure wird aus Witepsol H15 und Witepsol W35 annähernd gleich gut freigesetzt.

Die Apparatur II unterscheidet sich von der Apparatur I durch einen schnelleren und vollständigeren Freisetzungsverlauf und bessere Reproduzierbarkeit. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen sind aber kleiner. Damit sinkt auch die Anzahl an signifikanten Unterschieden zwischen den Formulierungen (geringeres Differenzierungsvermögen als Apparatur I).

Tabelle 6.4 Apparatur II

Prüfgröße: % freigesetzter Dosisanteil nach 390 Minuten, M_{390} [%]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	8,6	6,5 - 11,9
BH15:BW35	ns	0,9	-2,9 - 9,6
BH15:NW35	s	22,48	15,1 - 35,0
NH15:BW35	ns	-8,2	-11,3 - 0,4
NH15:NW35	s	12,94	6,8 - 26,2
BW35:NW35	s	20,4	14,1 - 34,4

Prüfgröße: Mittlere Verweilzeit, $t_{80\%}$ [h]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	-0,44	-0,51 - -0,22
BH15:BW35	s	-0,47	-0,18 - -0,03
BH15:NW35	s	-2,62	-3,12 - -2,24
NH15:BW35	ns	-0,03	-1,40 - 0,43
NH15:NW35	s	-2,18	-2,70 - -1,80
BW35:NW35	s	-1,94	-0,28 - -0,92

Prüfgröße: Varianz der Verweilzeiten, $Var_{t80\%}$ [h^2]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	-0,67	-1,20 - -0,30
BH15:BW35	ns	-2,95	-2,07 - 0,17
BH15:NW35	s	-3,59	-6,10 - -2,34
NH15:BW35	ns	0,35	-1,46 - 1,01
NH15:NW35	s	-2,92	-5,39 - -1,45
BW35:NW35	s	-3,33	-5,61 - -1,53

α = 0,05 ist nicht tabelliert

6.2.4 Apparatur III

Unterucht man die Formulierungen in der Freisetzungsapparatur nach Schoonen so unterscheiden sie sich vor allem im Ausmaß der Freisetzung (M_{390}). Diese Zielgröße schwankt zwischen 94 % für Benzoesäure aus Witepsol H15 und 51% für Natriumbenzoat aus Witepsol W35. Damit ergeben sich für die Extrapolation bei langsamer Freisetzung ähnliche Schwierigkeiten wie bei der Apparatur I.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test lassen sich Unterschiede zwischen den nach Versuchsende freigesetzten Mengen nachweisen. Die Unterschiede in den anderen Prüfgrößen sind weniger deutlich, als in den Apparaturen I und II.

Die paarweisen Vergleiche des freigesetzten Dosisanteils lassen Unterschiede erkennen, die sowohl durch die Änderung der Suppositoriengrundlage als auch durch die Wasserlöslichkeit der Testsubstanz bedingt sind (Wilcoxon-Rangsummentest). Witepsol H15 setzt den Wirkstoff vollständiger frei als Witepsol W35. Benzoesäure wird im Mittel rascher freigesetzt als Natriumbenzoat.

Die Effekte der schnell freisetzenden Grundlage und der rasch freigesetzten Substanz verstärken sich und unterscheiden sich deutlich von der Kombination aus unvollständig freisetzender Grundlage und langsam freigesetztem Wirkstoff. Eine Wechselwirkung, bei der sich dieselben Effekte vermindern zeigt sich beim Vergleich von Benzoesäure in Witepsol H15 und Natriumbenzoat in Witepsol W35. In dieser Kombination heben sich die Wirkungen von Grundlage und Testsubstanz fast auf. Bei der Apparatur III ist der Einfluß der Wasserlöslichkeit noch deutlicher ausgeprägt als bei den Apparaturen I und II.

Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen an Hand der Kenngrößen mittlere Verweilzeit und Varianz der Verweilzeiten sind dagegen weit geringer als in den Apparaturen I und II.

Tabelle 6.4 Apparatur III

Prüfgröße: freigesetzter Dosisanteil nach 390 Minuten, M_{390} [%]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	8,9	5,7 - 14,1
BH15:BW35	s	7,4	3,1 - 12,0
BH15:NW35	s	45,8	41,2 - 48,9
NH15:BW35	ns	-0,9	-7,5 - 3,1
NH15:NW35	s	37,4	27,9 - 39,5
BW35:NW35	s	37,2	32,6 - 41,8

Prüfgröße: Mittlere Verweilzeit, $\bar{t}_{80\%}$ [h]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	-0,23	-0,61 - 0,32
BH15:BW35	ns	-0,17	-0,82 - 0,42
BH15:NW35	s	-4,70	-5,08 - -4,08
NH15:BW35	ns	-0,02	-0,76 - 0,72
NH15:NW35	s	-4,47	-5,26 - -3,82
BW35:NW35	s	-4,43	-5,25 - -3,71

Prüfgröße: Varianz der Verweilzeiten, $Var_{t80\%}$ [h^2]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	-0,53	-0,79 - 0,25
BH15:BW35	ns	-0,19	-1,04 - 0,56
BH15:NW35	s	-16,22	-18,86 - -15,15
NH15:BW35	ns	0,245	-0,81 - 1,26
NH15:NW35	s	16,06	-19,03 - -12,66
BW35:NW35	s	16,50	-19,33 - -14,07

α = 0,05 ist nicht tabelliert

6.2.5 Apparatur IV

In der Durchflußzelle ist die freigesetzte Menge bei allen Formulierungen deutlich größer, als in den bisher besprochenen Apparaturen. Die Freisetzung erfolgt schneller und die Varianz der Verweilzeiten ist geringer. Die Streuung der Zielgrößen ist im Vergleich zu den anderen Apparaturen klein (Anhang A).
Trotz der fast vollständigen Freisetzung läßt der freigesetzte Dosisanteil doch noch Unterschiede zwischen den Suppositorien erkennen (Kruskal-Wallis). Die mittlere Verweildauer und Varianz der Verweildauern lassen ebenfalls Unterschiede zwischen den Suppositorien deutlich werden.
Mit der Durchflußzelle ist es nicht möglich, zwischen den Formulierungen Benzoesäure und Natriumbenzoat in Witepsol H15 zu unterscheiden. Für die drei Prüfgrößen ist der Median der Differenzen in diesem Fall nahezu Null. Dies ist besonders auffällig, da die Apparatur IV bei den anderen Vergleichen stets signifikante Unterschiede findet. Abweichend von den anderen Apparaturen wird in der Durchflußzelle aus Witepsol W35 signifikant mehr Natriumbenzoat als Benzoesäure freigesetzt. Die Durchflußzelle ermöglicht eine nahezu vollständige Beobachtung des Freisetzungsverlaufes für alle Formulierungen. Ihr Differenzierungsvermögen entspricht ungefähr dem der Apparatur I.

Tabelle 6.5 Apparatur IV

Prüfgröße: freigesetzter Dosisanteil nach 390 Minuten, M_{390} [%]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	8,6	-5,2 - 6,5
BH15:BW35	s	22,5	18,0 - 30,4
BH15:NW35	s	11,1	4,3 - 25,7
NH15:BW35	s	23,6	16,8 - 28,5
NH15:NW35	s	10,7	3,2 - 23,9
BW35:NW35	s	-13,6	-22,5 - -2,7

Prüfgröße: Mittlere Verweilzeit, $\bar{t}_{80\%}$ [h]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon - Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	0,08	-0,02 - 0,35
BH15:BW35	s	-0,57	-0,85 - -0,28
BH15:NW35	s	-1,30	-1,59 - -0,94
NH15:BW35	s	-0,63	-0,97 - -0,38
NH15:NW35	s	-1,40	-1,64 - -1,03
BW35:NW35	s	-0,67	-1,23 - -0,34

Prüfgröße: Varianz der Verweilzeiten, $Var_{t80\%}$ [h^2]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon - Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	0,02	-0,33 - 0,08
BH15:BW35	s	-1,64	-2,11 - -1,37
BH15:NW35	s	-0,91	-1,38 - -0,58
NH15:BW35	s	-1,49	-2,13 - -1,20
NH15:NW35	s	-0,91	-1,40 - -0,52
BW35:NW35	s	0,66	0,01 - 1,45

α = 0,05 ist nicht tabelliert

6.2.6 Apparatur V

Die Apparatur nach Tukker liefert gut reproduzierbare Freisetzungsverläufe. Aus allen Formulierungen wird der Wirkstoff vollständig freigesetzt. Aus allen Zubereitungen wird der Wirkstoff rasch und vollständig, aber etwas langsamer als in Apparatur IV freigesetzt. Die mittlere Verweildauer und Varianz der Verweildauern ergeben signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen (Kruskal-Wallis).
Beim paarweisen Vergleich (Wilcoxon-Rangsummentest) der mittleren Verweildauern findet man, daß abweichend von den anderen Apparaturen Natriumbenzoat signifikant schneller als Benzoesäure aus Witepsol H15 freigesetzt wird. In allen Fällen, in denen signifikante Unterschiede bei der mittleren Verweildauer gefunden wurde, galt das auch für die Varianz der Verweilzeit.
Das Differenzierungsvermögen der Apparatur für die Kenngrößen mittlere Verweilzeit und Varianz der Verweilzeiten entspricht dem der Apparatur IV.

Apparatur V

Prüfgröße: Dosisanteil freigesetzt nach 390 Minuten, M_{390} [%]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	ns	4,6	-1,4 - 12,5
BH15:BW35	ns	6,5	-1,7 - 15,1
BH15:NW35	s	8,6	3,1 - 13,1
NH15:BW35	ns	0,3	-5,3 - 10,5
NH15:NW35	ns	4,0	-1,8 - 8,8
BW35:NW35	ns	1,8	-6,5 - 7,0

Prüfgröße: Mittlere Verweilzeit, $t_{80\%}$ [h]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	0,60	0,32 - 0,95
BH15:BW35	ns	0,05	-0,57 - 0,53
BH15:NW35	s	1,05	-1,46 - -0,72
NH15:BW35	s	-0,60	-1,11 - -0,13
NH15:NW35	s	-1,63	-2,00 - -1,34
BW35:NW35	s	-1,05	-1,57 - -0,46

Prüfgröße: Varianz der Verweilzeiten , $Var_{t80\%}$ [h^2]			
paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Rangsummentest (α = 0,06)	Hodges-Lehmann (Median der Differenzen)	Konfidenzintervall (α = 0,06)
BH15:NH15	s	0,67	0,38 - 0,99
BH15:BW35	ns	0,32	-0,10 - 0,73
BH15:NW35	s	-1,09	-1,55 - -0,54
NH15:BW35	s	-0,33	-0,77 - 0,04
NH15:NW35	s	-1,77	-2,16 - -1,29
BW35:NW35	s	-1,43	-1,94 - -0,77

$\alpha \neq 0,05$ ist nicht tabelliert

6.2.7 Diskriminanzanalyse

Der Nachweis von Unterschieden zwischen Suppositorien mit Hilfe nur einer Kenngröße ist schwierig. Mittels der linearen Diskriminanzanalyse lassen sich die Unterschiede zwischen zwei Formulierungen in einer Apparatur aufgrund mehrerer Kenngrößen (M_{390} , $\bar{t}_{80\%}$, Var_{t80}) schätzen (Tabelle 6.7). Im Gegensatz zu den vorausgegangenen nichtparametrischen Tests müssen hierbei die Zielgrößen normalverteilt sein und die gleiche Streuung besitzen (Kap.6.1, 6.1.5). Parametrische Testverfahren besitzen für kleine Stichproben eine größere Schärfe als nichtparametrische Verfahren. Sind allerdings die oben angeführten Vorrausetzungen nicht erfüllt, besteht die Gefahr, daß Unterschiede gefunden werden, die nicht existieren (Fehler 1.Art). Die geringere Schärfe der nichtparametrischen Tests bei kleiner Stichprobenzahl führt in zu wenigen Fällen zur Ablehnung der Nullhypothese; es besteht kein Unterschied zwischen den Formulierungen (Fehler 2.Art).

	BH:NH	BH:BW	BH:NW	NH:BW	NH:NW	BW:NW
Apparatur I	+	+	+	+	+	+
Apparatur II	+	-	+	+	+	+
Apparatur III	+	-	+	-	+	+
Apparatur IV	-	+	+	+	+	+
Apparatur V	+	+	+	+	+	+

Tabelle Signifikante Untersschiede beim paarweisen Vergleich von unterschiedlichen Formulierungen
+ es besteht ein Unterschied ($\alpha = 0,05$)
(Diskriminanzanalyse, Zielgrößen : M_{390}, $\bar{t}_{80\%}$, $Var_{t80\%}$)

Die Apparatur I zeigt zwischen allen möglichen paarweisen Kombinationen der Testformulierungen Unterschiede auf. Die Apparatur III

findet für zwei Paare, die Apparatur II und III für je ein Paar keinen signifikanten Unterschied. Diese Ergebnisse decken sich mit den Aussagen der nichtparametrischen Tests.
Die Apparatur V zeigt wie die Apparatur I für alle Vergleiche signifikante Unterschiede auf, obwohl die Zielgröße nach Versuchsende freigesetzter Dosisanteil keinen Einfluß auf das Ergebnis der Diskriminanzanalyse hat.
Die Trennleistung der linearen Diskriminanzanalyse ließ sich durch die Hinzunahme von zwei weiterer Zielgrößen (Kurtosis, Schiefe) bei keiner Apparatur wesentlich verbessern.

6.3 Auswertung der in vivo-Daten

Die statistische Auswertung der in vivo-Daten wurde anhand von drei Parametern durchgeführt (F_{rel}, $\bar{t}_{80\%}$, $Var_{t80\%}$). Die relative Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die Vollständigkeit der Resorption nach Gabe eines Suppositoriums im Vergleich zum Klysmas. Für jeden Probanden wurden die in vivo-Freisetzungsgeschwindigkeitsververläufe einzeln mittels numerischer Dekonvolution nach dem Trapezverfahren (Kap. 5.2.3) rekonstruiert. Ihr Zusammenhang mit den entsprechenden Freisetzungskurven in vitro wird in Kapitel 7.2 statistisch untersucht.

Dazu müssen die Kurven durch wenige Kenngrößen charakterisiert werden. Behandelt man sie als statistische Verteilungsfunktionen und kennzeichnet sie durch ihre Momente, so können sie sowohl in vivo-, als auch in vitro-Freisetzungskurven durch Zielgrößen beschrieben werden, die auch bei unterschiedlicher Kinetik einen Vergleich ermöglichen. Die mittlere Verweilzeit läßt Unterschiede in den Freisetzungsgeschwindigkeiten erkennen. Die Varianz der Verweilzeiten beschreibt die Streung der Verweilzeiten und damit die Änderung der Freisetzungsgeschwindigkeiten im untersuchten Zeitraum. In vivo wurden ebenso wie in vitro für einige Formulierungen unvollständige Freisetzungsverläufe (Kap.5.2.1) beobachtet. Deshalb wurde auch bei der Berechnung der mittleren Verweilzeit und der Varianz der Verweilzeiten in vivo nur der Freisetzungsverlauf für 80% der eingesetzten Dosis berücksichtigt. Lediglich in den Fällen, in denen weniger als 80 % freigestzt wurden, mußten die Kurven extrapoliert werden. Anhand der Zielgrößen relative Bioverfügbarkeit (F_{rel}), mittlere Verweilzeit ($\bar{t}_{80\%}$) und Varianz ($Var_{t80\%}$) der Verweilzeiten sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich statistisch gesicherte Unterschiede im Freisetzungsverlauf nachweisen, die auf die Zubereitungen zurückzuführen sind, oder sind die interindividuellen Schwankungen größer, als die galenisch bedingten Unterschiede.
- Für welche Zubereitungen können im mehrfachen oder paarweisen Vergleich Unterschiede zwischen den Kenngrößen nachgewiesen wer-

den.

- Lassen sich die Unterschiede quantifizieren und läßt sich eine Reihenfolge bezüglich der Zielgrößen für die Formulierungen aufstellen?

Die Kenngrößen werden zunächst unabhängig voneinander mit nichtparametrischen Tests ausgewertet. Da jeweils mehrere Formulierungen an einem Probanden erprobt wurden handelt es sich um Tests für verbundene Stichproben (Kap. 6.1).
In Kapitel 6.15 werden Unterschiede zwischen den Suppositorien durch ein multivariates Verfahren (Diskriminanzanalyse) Unterschiede aufgezeigt.

6.3.1 Relative Bioverfügbarkeit

Die Flächen unter den renalen Ausscheidungsgeschwingkeitsprofilen werden nach der Trapezregel berechnet. Die Beobachtungszeit betrug mindestens 360 Minuten . Innerhalb dieses Beobachtungszeitraumes sinkt die Nachweisgrenze unter den Spiegel der endogen gebildeten Hippursäure. Deshalb war eine Extrapolation weder notwendig noch möglich. Die relative Bioverfügbarkeit wird durch den Vergleich der Flächen ($F_{u.\ Sup}$, $F_{u.\ Klys}$) ermittelt.

$$\text{relative Bioverfügbarkeit } (F_{rel}) = \frac{F_{u.\ Sup}}{F_{u.\ Klys}} 100 \quad [\%]$$

Tabelle 6.8 gibt die relativen Bioverfügbarkeiten der einzelnen Versuche wieder.

Proband	Suppositorium NH rel. Bioverf. %		Suppositorium BH rel. Bioverf. %		Suppositorium NW rel. Bioverf. %		Suppositorium BW rel. Bioverf. %	
E	108,9	(2)	118,6	(4)	81,9	(3)	79,9	(5)
E	125,0	(14)	99,2	(9)	71,5	(10)	86,9	(15)
E	89,9	(34)	98,8	(29)	57,5	(36)	86,8	(26)
D	110,8	(30)	97,0	(13)	78,6	(18)	69,2	(22)
A	80,3	(35)	86,9	(11)	72,5	(16)	66,7	(27)
C	90,4	(28)	96,7	(31)	-		-	
B	-		-		51,4	(21)	72,2	(23)
$\bar{x}$	109,5		99,5		68,9		77,0	
s	16,7		10,4		12,0		8,9	

Tabelle: relative Bioverfügbarkeit
(Versuchsnummer in Klammern)

Die höchste Bioverfügbarkeit zeigen die Formulierungen mit der Grundlage Witepsol H15. Die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen aus Witepsol W35-Suppositorien ist deutlich geringer.

Um den Einfuß der Variabilität der Probanden und zufällige Fehler von dem Effekt der Testsuppositorien trennen zu können, wurde der Friedman-Rangsummentest (Kap 6.1.4) durchgeführt. Diesem Testverfahren liegt folgendes Modell zu Grunde:

$$x_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$$

Die beobachtete Meßgröße (x_{ij}) , hier "relative Bioverfügbarkeit" setzt sich zusammen aus dem Gesamtmittel (μ), dem Einfluß des einzelnen Probanden (α_i), dem Effekt der Formulierung (β_j), sowie einem zufälligen Fehler (e_{ij}).
Der Friedman-Rangsummentest lässt anhand der Zielgröße relative

Bioverfügbarkeit einen signifikanten Unterschiede zwische den vier Testsuppositorien erkennen (α = 0.05).
Bei einem multiplen Vergleich zwischen den Testsuppositorien erweisen sich die Unterschiede zwischen den Grundlagen als signifikant unterschieden (α= 0.05,bzw. α= 0.1). Die Wasserlöslichkeit der Testsubstanz, Benzoesäure bzw. Natrium-benzoat hat keinen signifikanten Einflußauf die relative Bioverfügbarkeit. Für jeden Probanden liegen paarweise Beobachtungen für je zwei Formulierungen vor. Auf signifikante Unterschiede wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest geprüft (Kap. 6.1.2).
Die Ergebnisse für die paarweisen Vergleiche der Formulierungen finden sich in der Tabelle 7.9.
Die größten Unterschiede bezüglich der relativen Bioverfügbarkeit ergeben sich zwischen den Formulierungen Benzoesäure in Witepsol H15 und Natriumbenzoat in Witepsol W35.

Als Maß zur Charakterisierung der Differenzen zwischen den Zubereitungen wurde der Hodges-Lehmann Schätzer (Median der Walsh-Mittel, Kap. 6.1.2) verwendet. Die verteilungsfreien Vertrauensgrenzen für die zu erwar-tenden Bioverfügbarkeitsdifferenzen wurden nach Tukey bestimmt (88).
Der Median der 21 Walsh-Mittel für die Differenz zwischen Benzoesäure aus Witepsol H15 und Natriumbenzoat aus Witepsol W35 entspricht 31,8% . Der interpolierte 95% Vertrauensbereich liegt zwischen 15% und 47%. Die positiven Differenzen zeigen eine deutliche Verschlechterung der Bioverfügbar-keit bei Applikation der Formulierung Natriumbenzoat in Witepsol W35 an Stelle von Benzoesäure in Witepsol H15.
Aus den paarweisen Vergleichen ist der Einfluß der Grundlage deutlich zu ersehen. Die Bioverfügbarkeit aus Witepsol W35 ist signifikant geringer als die aus Witepsol H15. Bei gleicher Grundlage besteht die Tendenz der etwas höheren Bioverfügbarkeit für Benzoesäure gegenüber Natriumbenzoat.

paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest	Median der Walsh-Mittel [%]	95% Konfidenz-intervall [%]
BH : NH	ns	2,96	-2,2 - 16,3
BH : BW	s	22,32	12,2 - 42,2
BH : NW	s	31,86	15,6 - 46,2
NH : BW	s	23,56	5,7 - 40,6
NH : NW	s	32,32	12,6 - 49,1
BW : NW	ns	7,49	-0.8 - 26,7

Tabelle: 7.9 relative Bioverfügbarkeit: Paarweiser Vergleich von Suppositorien, s es besteht ein Unterschied ($\alpha = 0,05$)

6.3.2 Mittlere Verweilzeit

Die nach numerischer Dekonvolution erhaltenen mittleren Verweilzeiten ($\bar{t}_{80\%}$) sind in Tabelle 6.10 angegeben. Da nicht alle Suppositorien in der Beobachtungszeit vollständig freisetzten, wurden die Freisetzungsverläufe nur bis zur Freisetzung von 80% des eingesetzten Wirkstoffes verfolgt.

Proband	Suppositorium NH [h]	Suppositorium BH [h]	Suppositorium NW [h]	Suppositorium BW [h]
E	1,05 (2)	0,69 (4)	1,86 (3)	1,02 (5)
E	0,95 (14)	0,58 (9)	2,34 (10)	1,75 (15)
E	1,01 (34)	0,36 (29)	2,02 (36)	0,72 (26)
D	0,94 (30)	0,27 (13)	4,37 (18)	1,49 (22)
A	0,78 (35)	0,41 (11)	0,91 (16)	1,52 (27)
C	0,99 (28)	0,44 (31)	-	-
B	-	-	4,61 (21)	0,57 (23)
$\bar{x}$	0,95	0,46	2,69	1,18
s	0,094	0,1525	1.48	0,478

Tabelle: 6.10 mittlere Verweilzeiten
(Versuchsnummern in Klammern)

Der Friedman- Test läßt signifikante Unterschiede für die Kenngröße mittlere Verweilzeit zwischen den Suppositorien erkennen ($\alpha = 0,05$). Besonders deutlich ist wie bei der Zielgröße relative Bioverfügbarkeit der Unterschied zwischen den Suppositoriengrundlagen. Suppositorien aus Witepsol W35 zeigen eine langsamere Freisetzung als solche aus Witepsol H15. Auf die Testgröße mittlere Freisetzungsgeschwindigkeit hat die Testsubstanz ebenfalls einen Einfluß. Die Freisetzung des Natriumbenzoats erfolgt langsamer als die Freigabe von Benzoesäure.
Die Differenzen zwischen den Testsuppositorien im Bezug auf die Freisetzungsgeschwindigkeit und ihre Konfidenzintervalle sind in Tabelle 6.11 angegeben.

paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest (α =0,05)	Median der Walsh-Mittel [%]	95% Konfidenz-intervall [%]
NH : BH	s	0,51	0,37 - 0,65
BW : BH	s	0,73	0,18 - 1,20
NW : BH	s	2,30	0,69 - 4,14
BW : NH	ns	0,22	-0,38 - 0,78
NW : NH	s	1,78	0,27 - 3,63
NW : BW	s	1,30	-0,05 - 3,68

Tabelle: 6.11 Mittlere Verweilzeiten ($t_{80\%}$), paarweiser Vergleich, s es besteht ein Unterschied (α=0,05)

Der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest zeigt zwischen Benzoesäure und Natriumbenzoat einen deutlichen Unterschied. Besonders ausgeprägt ist die rasche Freisetzung von Benzoesäure bei den Paaren: NH : BH ; NW : BW). Auffallend ist der geringe Unterschied zwischen Benzoesäure in Witepsol W35 und Natriumbenzoat in Witepsol H15. Die Kombination aus schnell freisetzender Grundlage (Witepsol H15) und langsam freigesetztem Wirkstoff (Natriumbenzoat) zeigt fast die gleiche mittlere Verweilzeit wie die Kombination von langsam freisetzender Grundlage (Witepsol W35) und schnell freigesetztem Wirkstoff (Benzoesäure).
In Bezug auf die mittlere Verweilzeit heben sich die Effekte von Wirkstoff und Grundlage weitgehend auf.

6.3.3 Varianz der Verweilzeiten

Die Varianz der Verweildauern ($Var_{t80\%}$) ist ein Maß für die unterschiedliche Variabilität der Freisetzungsgeschwindigkeiten für die einzelnen Formulierungen. In der Tabelle 6.11 sind die individuellen Werte für die Probanden angegeben.

Proband	Suppositorium NH [h 2]	Suppositorium BH [h 2]	Suppositorium NW [h 2]	Suppositorium BW [h 2]
E	0,65 (2)	0,29 (4)	3,46 (3)	3,37 (5)
E	0,23 (14)	0,25 (9)	3,32 (10)	1,64 (15)
E	0,51 (34)	0,04 (29)	0,95 (36)	2,31 (26)
D	0,23 (30)	0,02 (13)	1,57 (18)	3,92 (22)
A	0,29 (35)	0,23 (11)	0,32 (16)	4,74 (27)
C	0,34 (28)	0,25 (31)	-	-
B	-	-	7,63 (21)	0,16 (23)
$\bar{x}$	0,38	0,18	2,64	2,78
s	0,17	0,12	2,64	2,11

Tabelle: 6.11 Varianz der Verweilzeiten
(Versuchsnummern in Klammern)

Mit der Kenngröße Varianz der Verweilzeit lassen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Testsuppositorien aufzeigen (Friedmann; α =0,05). Witepsol W35 verursacht eine breitere Streuung der Verweilzeiten als Witepsol H15, d.h. der Wirkstoff wird im gesamten Untersuchungszeitraum relativ gleichmäßig freigesetzt. Die unterschiedliche Löslichkeit der Testsubstanzen hat keinen eindeutigen Effekt auf die Zielgröße.
Die Streuung der Kenngröße Varianz der Verweilzeiten (2.zentrale Moment) ist größer als die der anderen Zielgrößen. Bei der Berechnung der höheren Momente treten Unterschiede in den terminalen Meßwerten besonders deutlich hervor (Kap.2.3.1).
Trotzdem lassen sich mit dem paarweisen Wilcoxon-Rangsummentest (Tabelle 6.12) Unterschiede nachweisen. Aus den Medianen der Walsh-Mittel ist deutlich ersichtlich, daß Unterschiede hauptsächlich durch die Grundlage verursacht werden.

paarweiser Vergleich der Suppositorien	Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest (α=0,05)	Median der Walsh-Mittel [h^2]	95% Konfidenz-intervall [h^2]
NH : BH	s	0,21	-0,02 - 0,44
BW : BH	s	2,65	0,3 - 4,33
NW : BH	s	2,31	0,26 - 6,04
BW : NH	s	2,26	0,38 - 4,22
NW : NH	s	2,07	0,11 - 5,95
NW : BW	ns	-0,34	-3,76 - 5,58

Tabelle: 6.12 Varianz der Verweilzeiten, paarweiser Vergleich, s=es besteht ein Unterschied (α=0,05)

6.3.5 Diskriminanzanalyse

Bei den bisher besprochenen Testverfahren wurden die Unterschiede zwischen den Suppositorien im Bezug auf einen einzelnen Bewertungsparameter beurteilt. durch die lineare Diskriminanzanalyse (Kap. 6.1.5) lassen sich die Unterschiede zwischen zwei Zubereitungen A und B aufgrund mehrerer Parameter schätzen und durch das Abstandsmaß (d_x) darstellen.

Für die beiden zu vergleichenden Formulierungen werden aus den Kenngrößen relative Bioverfügbarkeit($F_{rel} = x_1$), mittlere Verweilzeit ($\overline{t}_{80\%}=x$) und Varianz der Verweilzeiten ($Var_{t80\%}= x_2$) eine lineare Diskriminanzfunktion berechnet (87,90). Aus den entsprechenden Größen der einzelnen Kurvenverläufe wird dann mit Hilfe dieser Trennformel eine gemeinsame Zielgröße X gebildet (Gl. 6.11). Sie wird jeweils für A und B über alle Versuche gemittelt ($\overline{X}_A$, $\overline{X}_B$). Die Differenz der Mittelwerte wird als Abstandsmaß (d_x) bezeichnet.

Abb 6.2 zeigt in der oberen Zeile die relative Bioverfügbarkeit für Benzoesäure aus Witepsol H15, die 6 Striche entsprechen den 6 in vivo-Versuchen. In der Zeile darunter stehen die Werte für Natriumbenzoat aus Witepsol H15. Optisch läßt sich bereits erkennen, daß die relative Bioverfügbarkeit keine geeignete Zielgröße zur Trennung der beiden Versuchsreihen ist, weil die Bioverfügbarkeit der untersuchten Suppositorien (NH) stark schwankt und sich deshalb die Wertebereiche überlappen. Das ist bei der mittleren Verweilzeit nicht der Fall. Über die mittlere Freisetzungsgeschwindigkeit ist eine Trennung möglich. Weniger deutlich ist die Trennung über die Varianz der Freisetzungszeiten. Die Diskriminanzanalyse faßt diese Ergebnisse in der Trennformel (Gl. 6.14) zusammen. Die relative Bioverfügbarkeit wird mit dem Faktor 0,042 gewichtet und hat damit nur einen geringen Einfluß auf das Ergebnis der Trennung. Mittlere Freisetzungsgeschwindigkeit (Faktor 9,83) und Varianz der Verweilzeiten (Faktor 4,63) sind für die Berechnung der getrennten Werte (X) ausschlaggebend. Das Abstandsmaß der BH und N Suppositorien ist deutlich von Null unterschieden. Eine anschließende Varianzanalyse der Werte der Trennfunktion (87) zeigt, da die Unterschiede zwischen den zweiFormulierungen signifikant größe sind, als die Unterschiede innerhalb einer Zubereitung (a = 0.05). In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse aus den Diskriminanzanalyse für die paarweisen Unterschiede zwischen den Formulierungen angegeben.

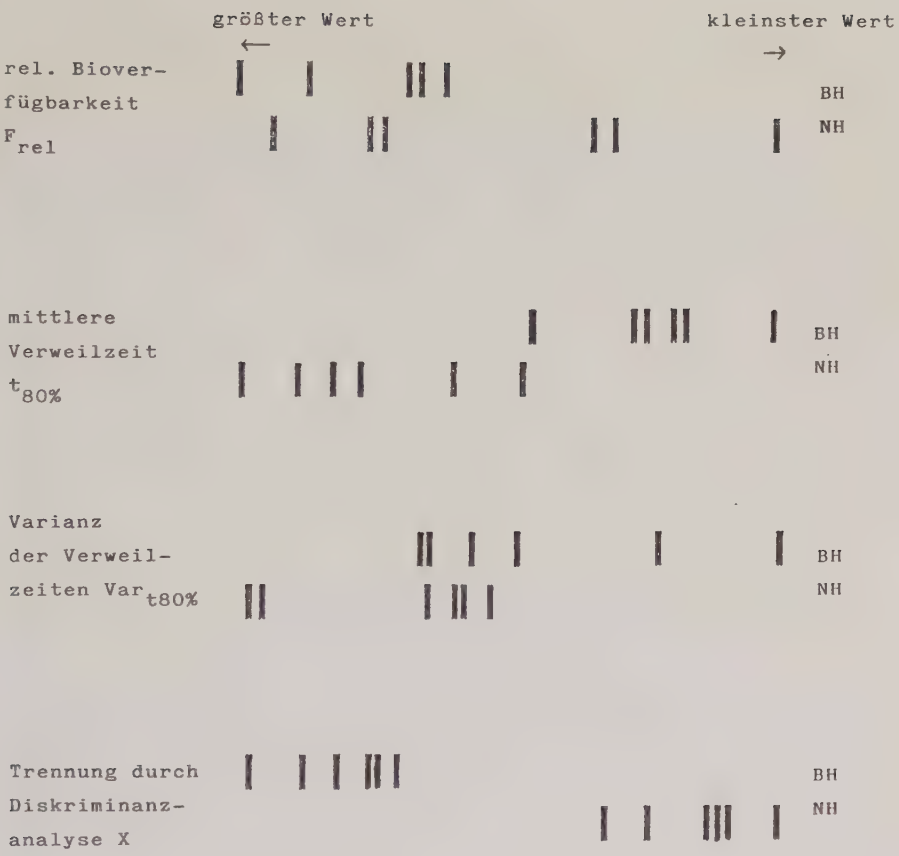


Abb. 6.2 Trennung durch lineare Diskriminanzanalyse
BH : NH

$$X = 0.042\ x_1 - 9.83\ x_2 + 4.63\ x_3 \qquad \text{Gl. 6.14}$$

paarweiser Vergleich Supposit.	Wichtung der rel. Bioverfüg.	Wichtung der mittl. Freisetzungs-geschw. $\bar{t}$	Wichtung der Var. der Freisetzungs-geschw. Var.	Abstands-maß d	Varianz-analyse (α=0,05
BH :NH	0,042	-9,83	4,66	3,9	s
BH :BW	0,018	-0.55	-0,06	0,99	s
BH :NW	0,018	-0,20	0,03	0,94	s
NH :BW	0,010	0,08	-0,15	0,65	s
NH :NW	0,014	-0,13	0,01	0,65	s
BW :NW	0,009	-0,18	0,07	0,33	s

Tabelle: 6.13 Ergebnisse der Varianzanalyse für den paarweisen Vergleich der Formulierungen in vivo
(s = es besteht ein Unterschied)

6.3.5 Zusmmenfassung der in vivo - Ergebnisse

Sowohl die verteilungsfreien Verfahren , als auch die auf der Normalverteilung basierende Diskriminanzanalyse läßt den Einfluß der Suppositoriengrundlagen auf die Freisetzung erkennen. In allen beobachteten Fällen wird aus Witepsol W35 weniger Wirkstoff freigesetzt als aus Witepsol H15. Die Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes hat bei den untersuchten Suppositorien keinen nachweisbaren Einfluß auf die relative Bioverfügbarkeit.
Aus der Grundlage Witepsol H15 wird Benzoesäure schneller als aus Natriumbenzoat freigesetzt. Die mittleren Verweilzeiten sind für Benzoesäure kleiner als für Natriumbenzoat. Bei der Verwendung von Witepsol W35 lassen sich diese Unterschiede nicht mehr erkennen.

7 In vivo-/in vitro- Korrelation

In der statistischen Terminologie gelten Merkmale als miteinander korreliert, wenn zwischen ihnen irgendwelche Zusammenhänge bestehen. Mit der Korrelationsrechnung kann kein Nachweis über die Existenz von Kausalbeziehungen geführt werden. Wenn zwei Merkmale (A,B) miteinander korreliert sind, kann das bedeuten:

- A verursacht eine Änderung von B
- B verursacht eine Änderung von A
- A und B bedeuten dasselbe
- A und B sind von weiteren unbekannten Variablen abhängig

In der Biopharmazie hat die in vivo-/in vitro- Korrelation die Aufgabe, Zusammenhänge zwischen den Freisetzungscharakteristika unterschiedlicher Arzneiformen in vivo und in vitro aufzuzeigen. Pharmakokinetische Untersuchungen sind Voraussetzungen für die Rekonstruktion der in vivo-Freisetzung (Kap. 2.3).
Die in vivo beobachteten Urindaten lassen trotz der hohen Variabilität der Daten Unterschiede zwischen den Suppositorien erkennen. Diese Variabilität und die Vorraussetzung, daß in allen Fällen die Freisetzung des Wirkstoffes und nicht die Resorption den geschwindigkeitsbestimmden Schritt beinhaltet, begrenzen von der Seite der in vivo-Daten die in vivo-/in vitro-Korrelation (Kap. 6.3).
Als Variable für die in vivo- / in vitro- Korrelation bieten sich Ausmaß und Geschwindigkeit der Freisetzung in vivo und in vitro an. Der Begriff in vivo-/in vitro- Korrelation wird in zwei Bedeutungen verwendet.

- in vivo- / in vitro- Zusammenhänge anhand einer Kenngröße, die an mehreren Formulierungen in vivo und in vitro bestimmt wird.
- in vivo- / in vitro- Beziehung zwischen den Freisetzungsverläufen einer Formulierung

7.1 Rangkorrelation von Kenngrößen in vivo und in vitro

7.1.1 relative Bioverfügbarkeit und freigesetzter Dosisanteil

Das Ausmaß der Freisetzung in vivo wird durch die relative Bioverfügbarkeit angegeben. In vivo wird der Einfluß der Grundlage auf die relative Bioverfügbarkeit besonders deutlich (Kap. 6.3). Bei den in vitro- Apparaturen wurde der nach 390 Minuten freigesetzte Dosisanteil berücksichtigt. Abbildung 7.1 zeigt das Ausmaß der Freisetzung für die in vivo- und in vitro- Versuche (Anhang A)
Die in vivo aufgefundene Rangordnung für die relative Bioverfügbarkeit ist in Tabelle 7.1 angegeben. In den Reihen darunter stehen die in den in vitro- Apparaturen beobachteten Reihenfolgen für den freigesetzten Dosisanteil. Die Reihenfolgen wurden aufgrund der Rangzahlen der Beobachtungen aufgestellt (Kap. 6.2).
In einigen Fällen konnte zwischen zwei aufeinanderfolgenden Formulierungen kein signifikanter Unterschied gefunden werden (ns). Die Unterschiede zwischen den weiter entfernten Formulierungen waren in vivo und in vitro bei den Apparaturen I - IV signifikant (Wilcoxon-Rangsummentest Kap. 6.2).

in vivo	BH	ns	NH	s	BW	ns	NW
Apparatur I	BH	s	NH	s	NW	ns	BW
Apparatur II	BH	ns	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur III	BH	s	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur IV	NH	ns	BH	s	NW	s	BW
Apparatur V	BH	ns	NH	ns	BW	ns	NW

Tabelle 7.1: Rangfolgen für die Formulierungen in vivo (F_{rel}) und in vitro (M_{390}); Wilcoxon-Rangsummentest, s = es besteht ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$)

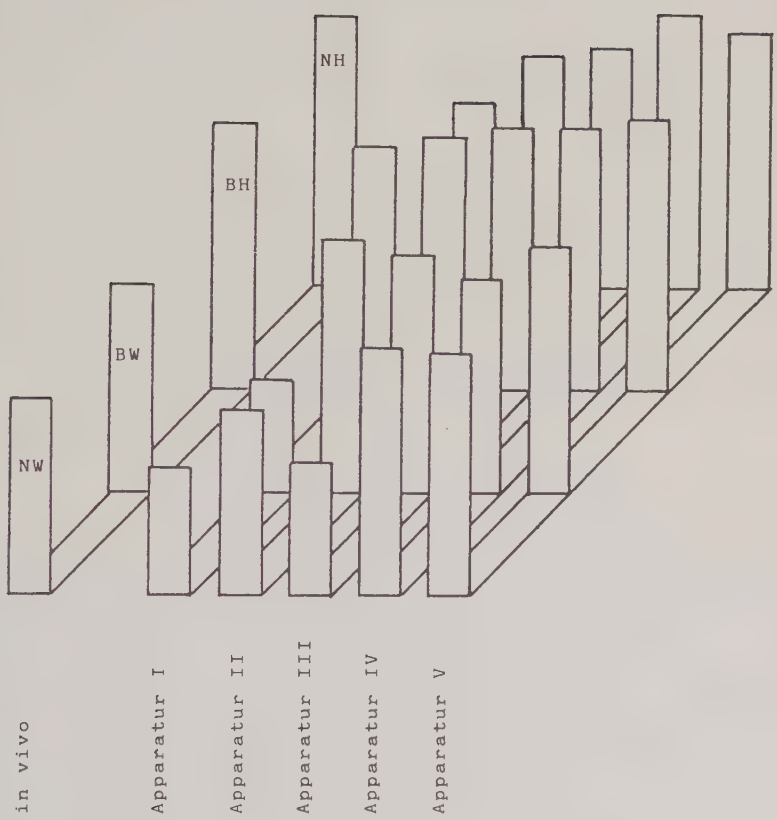


Abb 7.1 freigesetzte Menge Testsubstanz in vivo (F_{rel}) und in vitro (M_{390})

Mit den Apparaturen I und IV findet sich die gleiche Reihenfolge wie in vivo. Die Frage ob aus den beiden Grundlagen mehr Benzoesäure als Natriumbenzoat freigesetzt wird, kann aus den in vivo-Untersuchungen heraus nicht entschieden werden. Mit beiden Apparaturen lassen sich noch zwischen jeweils einem weiteren Suppositorienpaar Unterschiede erkennen. Das Differenzierungsvermögen der Apparaturen ist somit größer als die in vivo gefundenen Unterschiede. Nur mit einer größeren Anzahl an in vivo- Versuchen ließe sich klären, inwieweit es sich bei den von den Apparaturen gefundenen Unterschieden um Artefakte handelt.
In den Apparaturen II und III wurden andere Reihenfolgen als in vivo gefunden. Der in vivo signifikante Unterschied zwischen den Suppositoriengrundlagen in den Zubereitungen NH und BW ließen sich mit ihnen nicht nachweisen.
Die Apparatur V gibt die in vivo Reihenfolge wieder. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen in Bezug auf den freigesetzten Dosisanteil sind allerdings nicht signifikant (Kap. 6.2.1).

7.1.2 Mittlere Verweilzeit

Abbildung 7.1 zeigt die in vivo und in vitro beobachteten mittleren Verweilzeiten. Für einige Formulierungen (*) wurden in den Apparaturen I und III weniger als 80% der eingesetzten Menge freigesetzt (Anhang A). Die Extrapolation des weit über die Beobachtungszeit hinausgehenden Freisetzungsverlaufes führt zu sehr langen mittleren Verweilzeiten, die mit großen Unsicherheiten behaftet sind. Trotzdem läßt sich eine Rangfolge der mittleren Verweilzeiten in den Apparaturen I und II aufstellen, da die Rangfolgen der bei niedrigeren freigesetzten Dosisanteilen beobachteten mittleren Verweilzeiten mit den extrapolierten mittleren Verweilzeiten übereinstimmen.
In vivo wird der Wirkstoff im allgemeinen schneller freigesetzt als in vitro. Nur mit der Apparatur IV (Durchflußzelle) werden vergleichbare Freisetzungsgeschwindigkeiten erreicht.

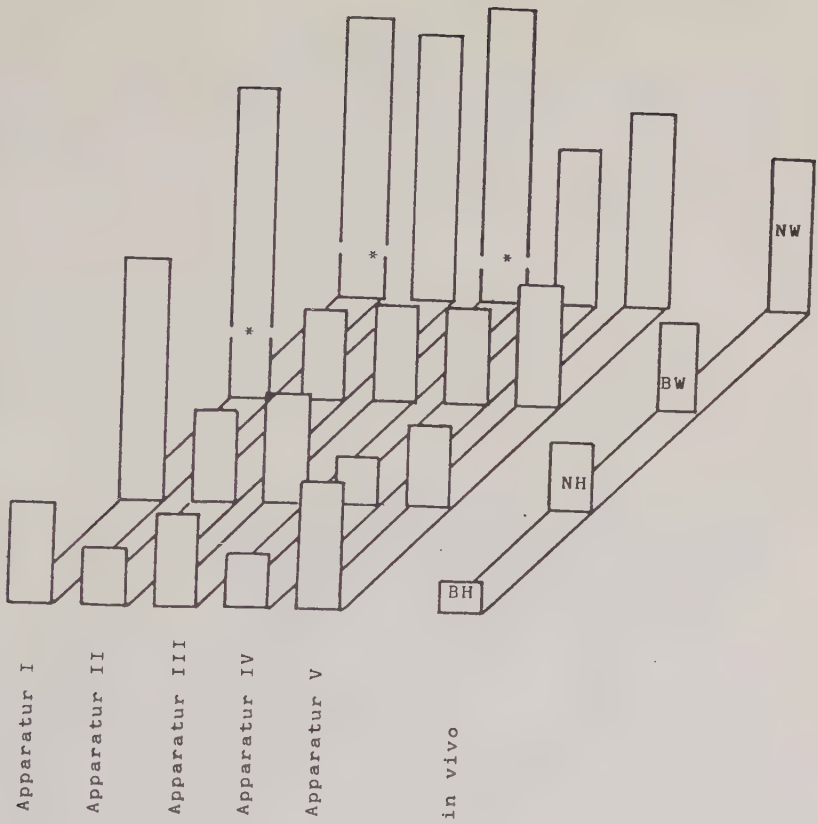


Abb. 7.2 mittlere Verweilzeit in vivo ($\bar{t}_{80\%}$) und in vitro ($\bar{t}_{80\%}$)
* extrapoliert

Die Rangfolgen für die mittleren Verweilzeiten in vivo und in vitro sind in Tabelle 7.2 wiedergegeben.

in vivo	BH	s	NH	ns	BW	s	NW
Apparatur I	BH	s	NH	s	BW	s	NW
Apparatur II	BH	s	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur III	BH	ns	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur IV	NH	ns	BH	s	BW	s	NW
Apparatur V	NH	s	BH	ns	BW	s	NW

Tabelle 7.2 Rangfolge für die mittleren Verweilzeiten der Formulierungen in vivo und in vitro (Wilcoxon-Rangsummentest; s signifikanter Unterschied, $\alpha = 0,05$)

In vivo stimmt die Reihenfolge der mittleren Verweilzeiten mit der Rangordnung des freigesetzten Dosisanteils überein. Während sich die mittleren Verweilzeiten für Benzoesäure und Natriumbenzoat in beiden Grundlagen signifikant unterscheiden, gilt das nicht für die freigesetzten Mengen, die resorbiert werden. Diesen Unterschied erkennt man mit allen Apparaturen für die Grundlage Witepsol W35. In den Durchflußzellen (Apparatur IV und V) wird im Gegensatz zu den in vivo-Versuchen und den Becherglasmethoden Natriumbenzoat schneller als Benzoesäure aus Witepsol H15 freigesetzt.
In der Apparatur II läßt sich unter der Vorausetzung, daß der Unterschied zwischen Natriumbenzoat aus Witepsol H15 und Benzoesäure aus Witepsol W35 nicht signifikant ist, die in vivo- Rangordnung nachweisen.

7.1.3 Varianz der Verweilzeiten

In Abbildung 7.3 sind die in vivo und in vitro beobachteten Varianzen der Verweilzeiten für die einzelnen Formulierungen angegeben. Sowohl in vivo als auch in vitro ist die Varianz der Verweilzeiten

für Formulierungen mit Witepsol H15 geringer, als für solche mit Witepsol W35; d.h. aus Witepsol H15 wird der Wirkstoff innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums freigesetzt, während sich die Freisetzung aus Witepsol W35 über einen längeren Zeitraum erstreckt. Vor allem in der Apparatur IV (Durchflußzelle) zeigen die Verweilzeiten nur eine geringe Streuung.

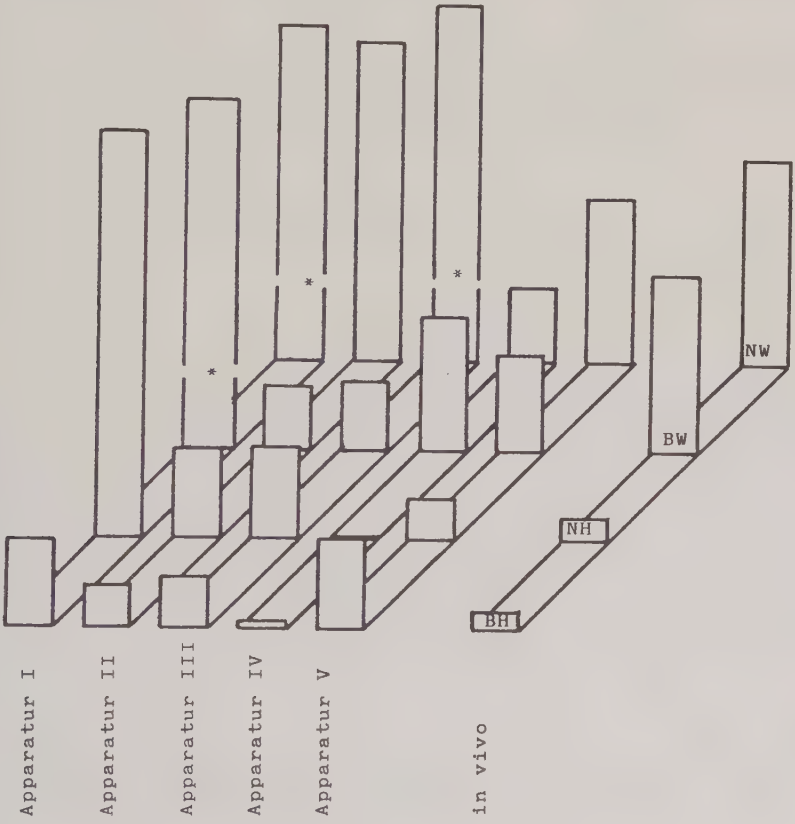


Abb. 7.3 Varianzen der Verweilzeiten ($Var_{t80\%}$)
in vivo und in vitro
* extrapoliert

in vivo	BH	s	NH	s	BW	ns	NW
Apparatur I	BH	s	NH	s	NW	ns	BW
Apparatur II	BH	ns	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur III	BH	ns	BW	ns	NH	s	NW
Apparatur IV	BH	ns	NH	s	BW	s	NW
Apparatur V	NH	s	BW	ns	BW	s	NW

Tabelle 7.3 Rangfolgen für die Varianz der Verweilzeiten in vivo und in vitro
(s signifikanter Unterschied, $\alpha = 0,05$)

7.2 Lineare Transformation der Zeitachsen

Mit Freisetzungsapparaturen sollte sich die in vivo beobachtete Rangfolge der Suppositorien hinsichtlich aller Kenngrößen reproduzieren lassen. Gleichzeitig sollten sich aber auch die in verschiedenen Apparaturen beobachteten Freisetzungsverläufe ineinander und in die Freisetzungsverläufe in vivo umrechnen lassen. Das ist möglich, wenn die Kurven äquivalent sind. Nach einer Definition von v.Hattingberg sind kumulative Auflösungskurven ($M_A(t)$, $M_B(t)$) äquivalent, wenn sie sich durch Stauchung und Dehnung ihrer Zeitachsen (b) ineinander überführen lassen. Die Kurven können um einen festen Zeitwert (a) gegeneinander verschoben sein (Gl. 7.1).

$$M_A(t) = M_B(a + b\,t) \qquad \text{Gl. 7.1}$$

Der Transformationsfaktor durch den der in vitro-Auflösungsverlauf in das in vivo-Freisetzungsprofil überführt werden kann läßt sich schätzen:

-über die mittleren Verweilzeiten mehrerer Formulierungen, die in einer Apparatur untersucht wurden (Kap. 7.2.1). Die Kurven werden

dazu anhand der Kenngröße mittlere Verweilzeit parametrisiert.
-über die gesamten Freisetzungsverläufe einer Formulierung in einer Apparatur (Levy-Plot, Kap.7.2.2)

7.2.1 Mittlere Verweilzeiten

In der Abbildung 7.4 sind die mittleren Verweilzeiten der Wirkstoffe in den untersuchten Suppositorien ($\bar{t}_{80\%,\ in\ vitro}$, n = 6) für die verschiedenen Apparaturen gegen die mittleren Verweilzeiten im biologischen System ($\bar{t}_{80\%,\ in\ vivo}$, n=6) aufgetragen.
Die Anwendung der linearen Regression auf die mittleren Verweildauern ist problematisch, da sowohl die in vivo als auch die in vitro bestimmten mittleren Verweilzeiten deutliche Streuungen aufweisen. Damit entfällt die Voraussetzung, daß die unabhängige Variable fehlerfrei ist. Die Streuung der mittleren Verweildauern sind zudem für die einzelnen Formulierungen unterschiedlich groß. Die Werte sind heteroskedastisch. Für die Anwendung einer verteilungsfreien Rangkorrelation reichen vier Punkte nicht aus (Abb7.4). Unter der Voraussetzung einer normalverteilten Grundgesamtheit für die mittleren Verweildauern läßt sich aufgrund der linearen Regression nur für die Apparaturen V, II und I ein von Null signifikant unterschiedener Korrelationskoeffizient bestimmen (93) (α =0,1).
Die Steigung gibt den Skalierungsfaktor an, um den die in vitro-Freisetzung schneller (>1) oder langsamer (<1) als in vivo verläuft. Die Freisetzungsgeschwindigkeit ist in der Apparatur IV etwa viermal schnel-ler als in der Apparatur I.
Der Ordinatenabschnitt ist eine Schätzung für die mittlere Verweildauer in vivo nach Gabe der Testsubstanz in Lösung . Die aus den Urindaten nach Gabe eines Klysmas berechnete mittlere Verweildauer beträgt 0,92 h (n = 6, s =±0,1). Die Ergebnisse aus den Apparaturen I und II liegen im Bereich der in vivo beobachteten mittleren Verweildauer. In den Apparaturen III und V war die Reihenfolge der Zubereitungen in Bezug auf die Zielgröße "mittlere Verweildauer" gegenüber den in vivo-Versuchen vertauscht (Kap. 7.1.2). Ein linea-

Apparatur I

Steigung: 0.27
Achsenabschnitt: 0,89
r = 0,907

Apparatur II
Steigung: 0.81
Achsenabschnitt: 0.84
r = 0,965

Apparatur III
Steigung: 0.36
Achsenabschnitt: 1.32
r = 0.88

Apparatur IV
Steigung: 1.48
Achsenabschnitt: 0.35
r = 0.977

Apparatur V
Steigung: 1.16
Achsenabschnitt: 0.13
r = 0.826

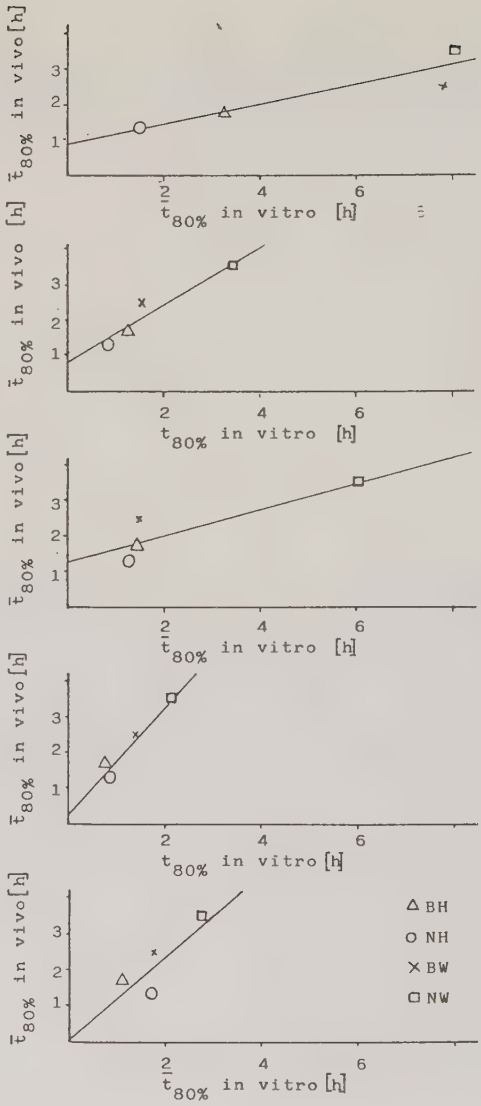


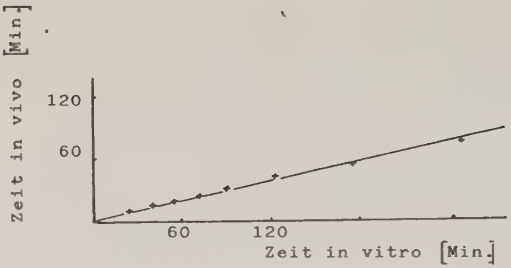
Abb. 7.4 mittlere Verweilzeiten ($\bar{t}_{80\%}$) mehrerer Formulierungen in vivo und in vitro (n=6)

rer Zusammenhang ist damit über alle vier Zubereitungen nicht mehr gegeben.

7.2.2 Levy-Plot

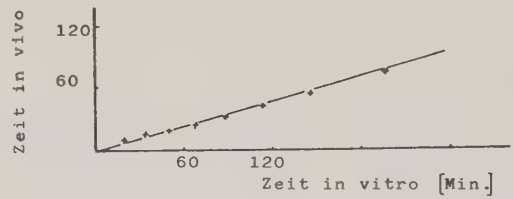
Bei dieser Darstellung werden die Zeiten gegeneinander aufgetragen, zu denen in vivo und in vitro die gleichen Substanzmengen freigesetzt sind. Hattingberg (52) schlug für dieses Verfahren zur graphischen Bestimmung des Zeitfaktors, mit dem sich die in vitro-Kurven in die in vivo-Kurven überführen lassen, die Bezeichnung Levy-Plot vor. Levy (92) diskutierte ihn bei einer Untersuchung an Acetylsalicylsäuretabletten, um Zusammenhänge zwischen dem Resorptionsverlauf und den in vitro-Freisetzungskurven aufzuzeigen. Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Freisetzungszeiten für gleiche Dosisanteile, so entspricht die Steigung der Regressionsgeraden dem Skalierungsfaktor, mit dem sich die in vivo-Freisetzungskurve in die in vitro-Freisetzungskurve überführen läßt. Dieser Faktor ist von der verwendeten Freisetzungsapparatur und der untersuchten Formulierung abhängig. Aus dem Achsenabschnitt berechnet sich der Verschiebungsparameter, um den in vivo- und in vitro- Freisetzungsverläufe zeitlich gegeneinander versetzt sind. Eine Korrelation ist bis zu dem insgesamt freigesetzten Dosisanteil möglich, der sowohl in vivo als auch in vitro beobachtet wurde.
Die Abbildung 7.5 zeigt die "Levy-Plots" für die Freisetzung von Benzoesäure aus Witepsol H15 in vivo und in den untersuchten Freisetzungsapparaturen. Die Zeiten, zu denen in vivo und in vitro gleiche Mengen Substanz freigesetzt sind, wurden durch lineare Interpolation aus den kumulativen Freisetzungsverläufen bestimmt. Danach wurden die Mittelwerte aus jeweils sechs Datensätzen in vivo und in vitro gebildet und gegeneinander aufgetragen. Die Ausgleichsgeraden wurde durch lineare Regression berechnet (Abb. 7.5).

Apparatur I BH
Steigung: 0.29
Achsenabschnitt: 0.63
r = 0.998
(n=6)

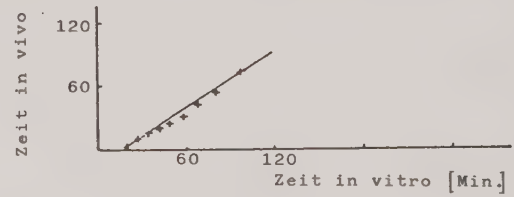


Apparatur II BH
Steigung: 0.32
Achsenabschnitt: 12.9
r = 0.947
(n=6)

Apparatur III BH
Steigung: 0.39
Achsenabschnitt: -5.7
r = 0.972
(n=6)



Apparatur IV BH
Steigung: 0.91
Achsenabschnitt: -19.9
r = 0.991
(n=6)



Apparatur V BH
Steigung: 0.29
Achsenabschnitt: -3.26
r = 0.985
(n=6)

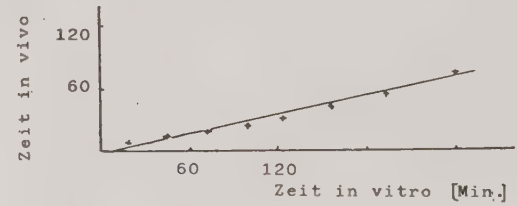
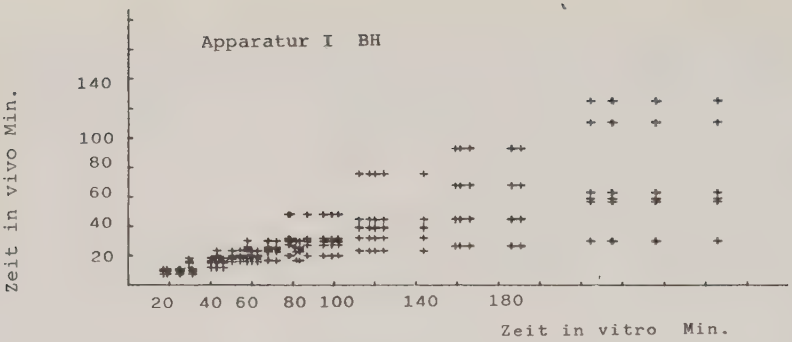


Abb. 7.5 "Levy-Plot" der gemittelten Freisetzungszeiten in vivo und in vitro (n=6)

Die Abbildung 7.5 läßt den Eindruck entstehen, daß ein optisch auffälliger linearer Zusammenhang zwischen den Freisetzungszeiten für gleiche Dosisanteile in vivo und in vitro für alle Apparaturen besteht. Trotz der hohen Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden ist eine kritiklose Interpretation im Bezug auf die einzelnen Apparaturen nicht ratsam.
Boxenbaum (69,70) konnte zeigen, daß die statistische Unabhängigkeit der Fehler, die bei der linearen Regression vorausgesetzt werden muß, für kumulative Kurvenverläufe nicht gegeben ist (Kap.2.4).
Durch die Mittelwertbildung aus den kumulativen Freisetzungsverläufen werden die Schwankungen innerhalb der in vivo- und in vitro-Versuche verschleiert. Wenn man anstelle der Mittelwerte alle möglichen Kombinationen zwischen den sechs in vivo und in vitro erhaltenen Freisetzungszeiten für gleiche Dosisanteile aufträgt, läßt sich das Ausmaß der Streuung der aufgetragenen Daten erkennen (Abb. 7.6). Die kumulative Auftragung führt dazu, daß Unterschiede der Freisetzungszeiten für die ersten Dezilen weiter in die Zeiten für insgesamt größere Dosisanteile mitgeschleppt werden. Graphisch resultiert daraus eine Auffächerung der aufgetragenen Daten (Abb. 7.6).
Die Varianz der Freisetzungszeiten für die insgesamt freigesetzte Menge steigt zusammem mit den in vivo und in vitro beobachteten Freisetzungszeiten, deshalb nimmt auch die Varianz der daraus gebildeten Mittelwerte entsprechend zu. Sowohl die in vivo- als auch die in vitro- Freisetzungsverläufe sind mit Fehlern behaftet. Die Auswertung des Levy-Plots mittels linearer Regression ist deshalb bei nicht vollständig reproduzierbaren in vivo- und in vitro-Freisetzungsverläufen problematisch (siehe Abschnitt 7.2.1).
In der Abbildung 7.6 sind alle möglichen Kombinationen der in vivo- und in vitro-Freisetzungszeiten für denselben Dosisanteil angegeben. Die daraus entstehenden Punktwolken lassen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Apparaturen erkennen. In der Apparatur I wird die Testsubstanz langsam freigesetzt. Die in vitro beobachteten Streuungen lassen in den Wiederholungsversuchen noch deutlich einen Unterschied zwischen der Zeit, zu der 70% bzw. 80% der Dosis



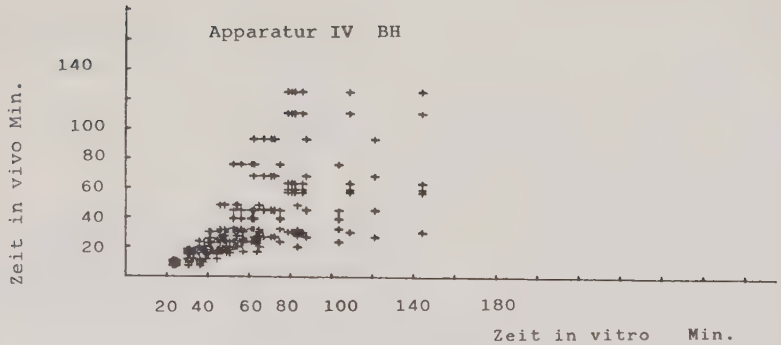


Abb. 7.6 "Levy-Plot" der Freisetzungszeiten in vivo und in vitro, Einzelwerte

freigesetzt sind, erkennen. Apparatur II unterscheidet sich von Apparatur I durch eine höhere Agitation des Akzeptormediums an der Grenzfläche zwischen geschmolzener Suppositorienmasse und Akzeptorflüssigkeit. Die Freisetzung erfolgt dementsprechend schneller. Die Apparaturen III (Suppositorium unter einer Glasplatte) und V (Membranmodell) zeigen ein ähnliches Freigabeverhalten wie die Apparatur II. In der Apparatur IV (Durchflußzelle) unterscheidet sich das Freisetzungsverhalten der Suppositorien deutlich von dem der anderen Apparaturen. Der Wirkstoff wird in vitro ebenso schnell wie in vivo freigesetzt. Auch die Streuungen der Zeiten, zu denen gleiche Dosisanteile freigesetzt sind, unterscheiden sich in vitro und in vivo nicht deutlich. Auffällig an den in der Apparatur IV beobachteten Freisetzungszeiten ist das lange Zeitintervall bis zur Freisetzung des ersten Dezils. Die Freisetzungszelle besteht aus Plexiglas, das Suppositorium wurde bei Raumtemperatur eingebracht und die Zelle danach in ein Wasserbad eingetaucht. Der Zeitraum, der zum Temperaturausgleich benötigt wird, ließe sich durch eine Verzögerung des Freisetzungsbeginns erklären.

7.3.3 Freisetzungszeiten für einzelne Dosisanteile

Beim "Levy-Plot" werden die Zeiten miteinander verglichen, zu denen gleiche Dosisanteile kumulativ freigesetzt worden sind.
Eine in vivo-/ in vitro-Korrelation ist auch möglich, indem man die Zeitspannen (z.B. Dezilenabstände $t_{\Delta\, i}$) miteinander vergleicht, die zur Freisetzung gleichgroßer Anteile der eingesetzten Dosis (z. B. der Dezilendifferenz Δ_i) benötigt werden. Dezil ($\xi_{i/10}$) und Dezilendifferenz(Δ_i) sind wie folgt definiert (89).

$$\Delta_1 = \xi_{0.1}$$
$$\Delta_2 = \xi_{0.2} - \xi_{0.3} \qquad i = 1,2,3 \ldots 10 \qquad \text{Gl. 7.2}$$
$$\Delta_i = \xi_{i/10} - \xi_{(i-1)/10}$$

Die Wahl des geeigneten Dosisquantils stellt einen Kompromiß dar,

zwischen der erforderlichen Glättung und der zeitlichen Auflösung des Kurvenverlaufs, die durch die Zahl der Meßwerte begrenzt ist.
Anhand der Abbildungen 7.7 erkennt man für die Apparatur I, daß der erste Dezilenabstand ($t_{\Delta 1}$, d.h. das Zeitintervall, das benötigt wird um die ersten 10% der Dosis frei zu setzen) und der Dezilenabstand ($t_{\Delta 8}$) zwischen dem siebten (ξ_7) und achten Dezil(ξ_8) länger ist, als die Zeitintervalle ($t_{\Delta 2-7}$) für gleichgroße Dosisanteile (Dezilendifferenzen), die dazwischen liegen.
Zu dieser Darstellung kommt man, indem man die kumulative Freisetzung als Verteilungsfunktion auffaßt. Anschließend bildet man nach Hartung (89) zur Berechnung der Quantile die verallgemeinerte inverse Verteilungsfunktion, die wiederum differenziert wird. Damit erhält man die Freisetzungszeiten aufeinander folgender Dezilenabstände, deren Summe gleich der Gesammtfreisetzungszeit ist. Durch diese Transformation gehen sigmoide kumulative Freisetzungsverläufe in U-förmige Verteilungen (Abb. 7.7 Apparatur I, III, Abb. 7.8 Apparatur IV), exponentielle Verläufe in J-förmige Verteilungen (Apparatur II) und lineare Freisetzungsvorgänge (0.Ordnung)in Gleichverteilungen über (Apparatur IV).
Störungen im Freisetzungsverlauf in vivo und in vitro beeinflussen bei dieser Darstellung nur noch das Dezil, in dem sie auftreten. Eine apparativ bedingte Verzögerungszeit der Freisetzung würde zum Beispiel nur den ersten Dezilenabstand beeinflussen.
Wenn sich die in vivo- und in vitro- beobachtete Kurvenverläufe nur in ihrer Geschwindigkeit unterscheiden, lassen sich die zugehörigen Dezilenabstände durch Multiplikation mit einem Faktor ineinander umrechnen. Die in vivo- und in vitro Freisetzungskurven sind äquivalent . Es treten in vivo und in vitro keine Verzögerungs-zeiten auf. Für diesen Fall läßt sich der Transformationsfaktor nach verschiedenen Methoden berechnen.
Anstelle der Freisetzungszeiten können auch die Geschwindigkeiten dargestellt werden, mit denen gleiche Dosisanteile freigesetzt werden. Die Freisetzungsgeschwindigkeiten ($V_{\Delta i}$) sind die reziproken Werte der Freisetzungszeiten ($t_{\Delta i}$). In der graphischen Darstellung wird die U-förmige Verteilung in eine glok-kenförmige umgewandelt (Abb. 7.8).

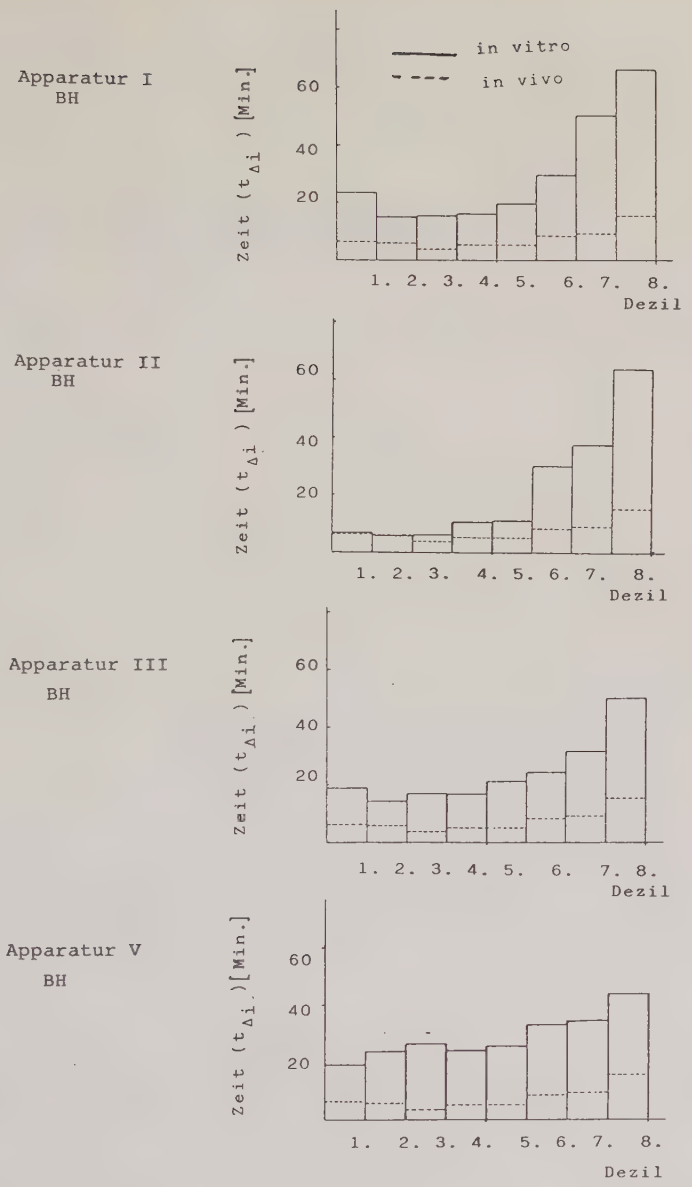
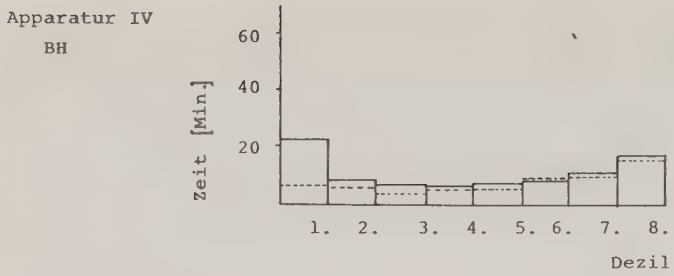


Abb. 7.7 Freisetzungszeiten (t_i) für das 1. - 8. Dosis-dezil (Median n = 6)



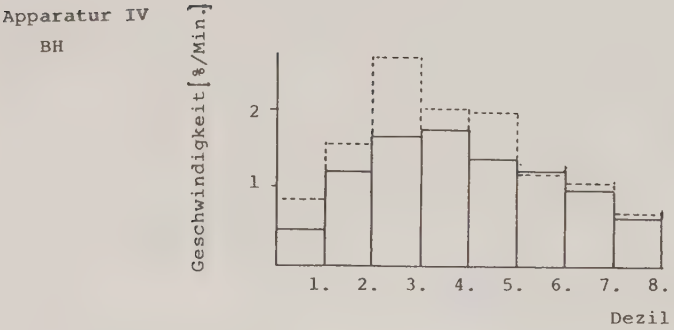


Abb. 7.8 Apparatur IV

Freisetzungszeit (Dezilenabstand $t_{\Delta i}$) gegen das 1. - 8. Dosisdezil

Freisetzungsgeschwindigkeit ($V_{\Delta i}$) gegen das 1. - 8. Dosisdezil

Bei fehlerfreien äquivalenten Freisetzungsverläufen gibt es drei gleichwertige Möglichkeiten, den Transformationsfaktor zu berechnen:

-aus dem Quotienten der Zeiten, zu denen in vivo und in vitro gleiche Mengen kumulativ freigesetzt worden sind (t_Q , Gl. 7.3). Der Faktor (b) ent spricht der Steigung der Ausgleichsgeraden des "Levy- Plots".

$$b = \frac{t_{Q,\ vivo}}{t_{Q,\ vitro}} \qquad \text{Gl. 7.3}$$

-aus dem Quotienten der harmonischen Mittel (X_h) der Freisetzungsgeschwindigkeiten ($V_{\Delta i}$) für die einzelne Dosisquantile darstellen (Gl. 7.4).

$$b = \frac{X_h\ (\ V_{\Delta i,vitro})}{X_h\ (\ V_{\Delta i,vivo})} \qquad \text{Gl. 7.4}$$

-aus dem Verhältnis der mittleren Verweilzeit in vivo ($\bar{t}_{80\%}$) und in vitro ($\bar{t}_{80\%}$), (Gl. 7.5).

$$b = \frac{\bar{t}_{80\%,\ vivo}}{\bar{t}_{80\%,\ vitro}} \qquad \text{Gl. 7.5}$$

Aufgrund von analytischen Fehlern, mangelnder Reproduzierbarkeit der in vitro- Freisetzung und der Variabilität der in vivo- Daten werden sich in vivo- und in vitro-Kurven außer in ihren Freisetzungsgeschwindigkeiten immer auch in ihren Kurvenformen unterscheiden. Damit sind die nach den Gleichungen 7.3 bzw. 7.4 und Gleichung 7.5 bestimmten Faktoren nicht mehr identisch.

χ^2-Test auf Vorliegen äquivalenter Verteilungen beliebiger Form

Ein Maß für den zwischen einer beobachteten (transformierten in vitro-Freisetzungskurve) und einer erwarteten Häufigkeit (in vivo-Freisetzungsverlauf) bestehenden Unterschied ergibt sich durch:

$$^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(b\ t_{\Delta i,vitro} - t_{\Delta i,vivo})^2}{t_{\Delta i,vivo}} \qquad \text{Gl. 7.6}$$

Der χ^2-Signifikanztest setzt voraus, daß die Gesamthäufigkeit (N) der beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gleich groß sind. Diese Voraussetzung ist im vorliegenden Fall erfüllt.

$$N = b\ t_{\Delta i,vitro} = t_{\Delta i,vivo} \qquad \text{Gl. 7.7}$$

In Abbildung 7.7 sind die in vivo- und in vitro-Freisetzungszeiten gegen die freigesetzten Dosisanteile aufgetragen. Die in vitro-Freisetzungszeiten werden so transformiert, daß die Gesamtfreisetzungszeit in vivo der Gesamtfreisetzungszeit in vitro entspricht (Gleiche Gesamthäufigkeit). Als Transformationsfaktor ergibt sich danach:

$$b = \frac{t_{\Delta i,vivo}}{t_{\Delta i,vitro}} \qquad \text{Gl. 7.8}$$

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Apparaturen aufzuzeigen, wurden für jede Apparatur die sechs Wiederholungsversuche mit den sechs in vivo-Freisetzungsverläufen paarweise verglichen . Damit ergeben sich für jede Formulierung 36 mögliche in vivo/in vitro-Kombinationen, für die ein Transformationsfaktor berechnet (Tabelle 7.4) und ein χ^2-Test durchgeführt wurden. In Tabelle 7.5 sind die Anzahl der nicht signifikant unterscheidbaren Verteilungen in Abhängigkeit von der verwendeten Apparatur und der untersuchten Formulierung aufgeführt.

	BH	NH	BW	NW
Apparatur I	0.24(80%)	0.29 (70%)	0.11 (40%)	0.24 (40%)
Apparatur II	0.37(80%)	0.57 (80%)	0.88 (70%)	0.54 (60%)
Apparatur III	0.30(80%)	0.57 (80%)	0.96 (70%)	0.32 (50%)
Apparatur IV	0.69(80%)	0.74 (80%)	0.98 (70%)	1.30 (70%)
Apparatur V	0.26(80%)	0.82 (80%)	0.95 (70%)	0.97 (80%)

Tabelle 7.5 Transformationsfaktoren in Abhängigkeit von der verwendeten Apparatur und der untersuchten Formulierung (g Median, n = 36)

Sowohl in vivo- als auch in vitro- wurden nicht für alle Formulierungen vollständige Freisetzungsverläufe beobachtet (Kap. 5.2.1,

Anhang A). Deshalb wurden die Freisetzungszeiten nur für die sowohl in vivo als auch in vitro freigesetzten Dosisdezile verglichen.

	BH	NH	BW	NW
Apparatur I	20 (80%)	4 (70%)	12 (40%)	18 (40%)
Apparatur II	12 (80%)	1 (80%)	3 (70%)	9 (60%)
Apparatur III	25 (80%)	5 (80%)	3 (70%)	12 (50%)
Apparatur IV	12 (80%)	2 (80%)	7 (70%)	11 (70%)
Apparatur V	19 (80%)	4 (80%)	6 (70%)	11 (80%)

Tabelle: 7.5 Anzahl der Kurvenpaare, bei denen kein signifikanter Unterschied zwischen den in vivo- und den transformierten in vitro Freisetzungszeiten besteht. (X^2 , $\alpha = 0,01$)

Offenbar hängt die in vivo-/in vitro-Korrelierbarkeit der Freisetzungsverläufe stärker von den Eigenschaften der Suppositorien als von der verwendeten Apparatur ab. Die in vitro Freisetzungsgeschwindigkeitskurven von Benzoesäure aus Witepsol H15 zeigen in allen Apparaturen ein deutliches Maximum, das auch in vivo beobachtet wurde. Deshalb lassen sich mit dem X^2 Test für den Vergleich zwischen den transformierten in vitro-Freisetzungszeiten und den in vivo-Freisetzungszeiten weniger signifikant unterschiedene Kurvenpaare finden, als bei den anderen Formulierungen. Die Freisetzungsgeschwindigkeitsprofile von Na-triumbenzoat aus Witepsol W35 sind im Vergleich zu den anderen Formulierungen sowohl in vivo als auch in vitro flach und insofern ähnlich. (Kap. 6.3, Anhang A). Auch hier läßt sich mit dem X^2 Anpassungstest ein deutlicher Zusammenhang zwischen den transformierten in vitro-Freisetzungszeiten und den in vivo-Freisetzungszeiten nachweisen. Die Unterschiede zwischen den Freisetzungsapparaturen sind weniger deutlich ausgeprägt als zwischen den Formulierungen. Bei den Rührgefäßmethoden muß berücksichtigt werden, daß im Versuchszeitraum bei einigen Formulierungen in vitro deutlich weniger Wirkstoff als

in vivo freigesetzt wurde. Mit den Ergebnissen des Test läßt sich bei diesen Apparaturen nur ein Bruchteil des gesamten in vivo Freisetzungsverlaufes beschreiben. In der Apparatur II (ohne Körbchen) ist die Strömungsgeschwindigkeit an der Grenzfläche zwischen geschmolzener Suppositorienmasse und Akzeptormedium höher als in der Apparatur I. Dadurch wurde im Versuchszeitraum mehr Wirkstoff freigesetzt. Die Apparatur II zeigt für die ersten beiden Dezile in vitro kleinere Freisetzungszeiten als in vivo (Abb. 7.7). Die Freisetzungszeiten der letzten drei Dezilendifferenzen entsprechen den in der Apparatur I gefundenen. Die Freisetzungskurven aus der Apparatur II sind damit nach der Definition von v. Hattingberg (52) den in vivo-Funktionen nicht äquivalent (Levy-Plot, Abb. 7.5). Durch den χ Quadrat Testes läßt sich zeigen, daß die Anpassungen der Freisetzungszeiten aus der Apparatur II stärker von den in vivo- Werten abweichen, als die der Apparatur I. Anhand der Apparaturen IV und V können die gesamten in vivo-Freisetzungsverläufe bis zum siebten und achten Dezil mit den in vitro-Freisetzungsprofilen der untersuchten Formulierungen verglichen werden. Bei der Apparatur IV (Durchflußzelle) läßt sich die Apassung der in vitro-Freisetzungsverläufe an die in vivo-Verläufe wesentlich verbessern, wenn für die Vergleiche nur das zweite bis achte Dezil berücksichtigt wird (Anzahl der Kurvenpaare, die sich nicht signifkant unterscheiden, BH (24), NH (16), BW (8), NW (15), $\alpha = 0{,}01$). Eine Verzögerung des Beginns der Freisetzung in vivo gegenüber der Freisetzung in vivo wurde bereits in vorherigen Kapitel im Zusammen-hang mit dem "Levy-Plot" diskutiert.

Freisetzungsgeschwindigkeiten der Dezilendifferenzen

In der Abbildung 7.8 sind Freisetzungszeiten und Freisetzungsgeschwindigkeit exemplarisch für die Apparatur IV dargestellt. Die mittlere Freisetzungsgeschwindigkeit wird gegen das 1.-8. Dezil aufgetragen (Median n=6).
Die Kurvenformen in vivo un in vitro sind sich zwar ähnlich, unterscheiden sich aber in ihrem Verlauf (z.B. in vivo liegt das Maximum

der Freisetzungsgeschwindigkeiten im dritten Dosisdezil, in der Apparatur IV im vierten). Die Kurven sind damit nicht vollständig äquivalent (siehe Kap 7.3.3). Ein Transformationsfaktor mit dessen Hilfe sich auch nicht vollständig äquivalente Kurvenverläufe möglichst deckungsgleich ineinander überführen lassen kann direkt aus den Freisetzungsgeschwindigkeiten der Dezilendifferenzen berechnet werden. Der Transformationsfaktor(b') wurde so gewählt, daß die Summe der Fehlerquadrate zwischen den vivo beobachteten Geschwindig-keiten ($V_{\Delta i}$) und den transformierten in vitro Geschwindigkeiten ($b' V_{\Delta i}$) möglichst gering wird.

$$\sum (b' V_{\Delta i,\ vitro} - V_{\Delta i,vivo})^2 \stackrel{!}{=} \text{Minimum}$$

In Tabelle 7.6 sind Transformationsfaktoren für die Dezile der vier in den Apparaturen I-V untersuchten Formulierungen wiedergegeben. Zur Berechnung der Tabellenwerte wurden für jede Apparatur die sechs Wiederholungsversuche mit den sechs in vivo-Freisetzungsverläufen paarweise verglichen. Aus jedem Vergleich wurden ein Transformationsfaktor berechnet, bei dem die Summe der Abweichungsquadrate zwischen der in vivo- Treppenfunktion und der entsprechenden in vitro- Funktion minimal ist. Von diesen 36 Transformationsfaktoren ist in der Tabbelle 7.6 der Median angegeben. Der Median ist unempfindlich gegen "Ausreißer" in den in vivo- oder in vitro-Kurven.
Die in Apparatur I (Rührgefäßmodell, Drahtkörbchen) beobachteten Freisetzungsgeschwindigkeiten sind deutlich langsamer als in vivo. In der Apparatur IV (Durchflußzelle) lassen sich den in vivo-Verläufen entsprechende Liberationsgeschwindigkeiten erkennen. Im vorausgegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, daß mit beiden Apparaturen Freisetzungsverläufe erhalten werden, die den in vivo-Verläufen vor allem für die Suppositorien Benzoesäure in Witepsol H15 und Natriumbenzoat in Witepsol W35 recht ähnlich sind. Ein Zusammenhang zwischen der Freisetzungsgeschwindigkeit in einer Apparatur und der Güte der in vivo-/in vitro Korrelation scheint

nicht zu bestehen.

Freisetzungs-apparartur	Formulierung			
	BH	NH	BW	NW
Apparatur I	0.31(80%)	0.40(60%)	0.19(40%)	0.31(40%)
Apparatur II	0.71(80%)	1.11(80%)	0.67(70%)	0.55(60%)
Apparatur III	0.30(80%)	0.66(80%)	0.71(70%)	0.30(50%)
Apparatur IV	0.66(80%)	1.96(80%)	0.83(70%)	1,25(70%)
Apparatur V	0,30(80%)	0.91(80%)	0.40(70%)	1,0 (70%)

Tabelle 7.6 Transformationsfaktoren (b'^{-1}) in Anhängigkeit von der verwendeten Apparatur und den untersuchten Suppositorien (in Klammern der bis zum Versuchsende freigesetzte Dosisanteil)

Die gefundenen Transformationsfaktoren für die Apparaturen I, III, IV und V sind in etwa den Ergebnissen der Abbildungen 7.5 vergleichbar.
Für die Apparatur II findet sich unter Berücksichtigung der Freisetzungsgeschwindigkeit der Dezilendifferenzen ein höherer Transformationsfaktor als in der Abb. 7.5, weil die Freisetzungsgeschwindigkeit im ersten Abschnitt deutlich höher ist und dies bei der kumulativen Auswertung nicht berücksichtigt wird. Der "Levy-Plot" läßt die entsprechenden Abweichungen der Freisetzungszeiten für die ersten Dosisdezile deutlich erkennen.
Betrachtet man nur die Versuche, bei denen mehr als 70% der eingesetzten Dosis freigesetzt wurden, so fällt auf, daß Suppositorien, die Natriumbenzoat enthalten, einen kleineren Transformationsfaktor besitzen als Zubereitungen mit Benzoesäure.
Die Ursache dafür ist bei den Freisetzungsapparaturen zu suchen, da in vivo der Wechsel von Benzoesäure zu Natriumbenzoat eine geringere Freisetzungsgeschwindigkeit verursachte (Kap. 6.3.2).

Bei den Apparaturen IV und V zeigte sich bereits bei den mittleren Verweilzeiten eine gegenüber den in vivo-Ergebnissen veränderte Reihenfolge (Kap 7.1.2). Natriumbenzoat wurde bei gleicher Grundlage schneller freigesetzt als Benzoesäure. Für diese Apparaturen wurden kleine Transformationsfaktoren gefunden, weil die Freisetzung von Natriumbenzoat gegenüber der von Benzoesäur in vivo langsamer und in vitro rascher verläuft.
Derselbe Effekt wird, wenn auch weniger deutlich, bei den anderen Freisetzungsgeräten erkennbar. Bei diesen Apparaturen wird zwar die richtige Reihenfolge eingehalten, trotzdem besteht auch bei ihnen die Tendenz, den Unterschied in der Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure und Natriumbenzoat weniger deutlich aufzuzeigen als in vivo.
Dieser gemeinsame Mangel der hier untersuchten Apparaturen beruht möglicherweise darauf, daß in vitro eine unphysiologisch hohe Flüssigkeitsmenge zur Auflösung zur Verfügung steht. Druck- und Scherbewegungen des Rektums werden durch hydrodynamische Bewegungen des Akzeptormediums ersetzt. Dadurch können bei den Apparaturen IV und V ähnliche Freisetzungsgeschwindigkeiten wie in vivo beobachtet werden. Anhand dieser Apparaturen wird aber auch der Effekt der Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes gegenüber den in vivo Ergebnissen stärker betont und dadurch eine gegenüber den in vivo Versuchen verschiedene Rangfolge der mittleren Verweildauern verursacht.

7.4 Diskussion der Ergebnisse

Im Versuchszeitraum wurde aus Witepsol H15 in vivo mehr Benzoesäure freigesetzt als aus Witepsol W 35, unabhängig davon, ob im Suppositorium die Salz- oder Säureform vorlag. Die Liberation von Benzoesäure erfolgt schneller als die von Natriumbenzoat. Dafür können physikalische Eigenschaften der Suppositorien (höherer Steigschmelzpunkt, längere Durchschmelzzeit, Tabellen 3.1, 3.2) oder ein unterschiedliches Resorptionverhalten verantwortlich gemacht werden. Bei der Gabe von Benzoesäure ist das Dissoziationsgleichgewicht gegenüber Natriumbenzoat zur undissoziierten Seite versche-

ben. Deshalb ist eine schlechtere Resorption zu erwarten (pH-Verteilungshypothese). Andererseits lassen Untersuchungen von Böttger (78) die Vermutung zu, daß die Rektalschleimhaut in der Lage ist innerhalb gewisser Grenzen den pH zu regulieren.

Apparatur I

Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen der Apparatur I liegen über dem Durchschnitt der anderen Apparaturen (Kap. 6.2). Die Freisetzungsgeschwindigkeit ist in der Apparatur I deutlich niedriger als in vivo. Das führt zwangsläufig zu sehr langen Beobachtungszeiten bei Formulierungen mit einer langsamen Wirkstofffreisetzung. Aus Witepsol W35 wurden innerhalb von 6,5 Stunden nur ca. 40% der eingesetzten Dosis wiedergefunden (Anhang A). Im Rahmen der in vivo-/in vitro-Korrelation ließen sich für die hier untersuchten Kenngrößen; bis zum Versuchsende (390 Minuten) freigesetzte Wirkstoffmenge, mittlere Verweilzeit und Varianz der Verweilzeit dieselben Rangfolge wie in vivo beobachten. Auch die in vivo- undin vitro-Freisetzungsverläufe ließen weitgehend durch Transformation der Zeitachsen ineinander überführen. bei langsamer Freisetzung erstreckt sich die Korrelation nur auf den Verlauf bis zum vierten Dezil (Kap. 7.2). Die Apparatur I ist einfach zu handhaben. Der apparative Aufwand ist gering.

Apparatur II

Die Apparatur II ist eine modifizierte Form der Apparatur I. Das Drahtkörbchen wurde entfernt, um die Strömungsgeschwindigkeit an der Grenzfläche zwischen der Suppositorienmasse und dem Akzeptormedium zu erhöhen. Dadurch fand eine schnellere Wirkstofffreisetzung statt. Reprodzierbarkeit und Differenzierungsvermögen sind geringer als in der Apparatur I (Kap. 6.2.1). Die Freisetzungskurven weichen in ihrer Verlaufsform von den in vivo-Freisetzungskurven ab (Kap. 7.2), weil ein Teil des Wirkstoffes zu Versuchsbeginn deut-

lich schneller freigesetzt wird. Deshalb konnte nur bei einem kleinen Anteil der Kurven eine Übereinstimmung zwischen den in vivo- und in vitro- Kurvenverläufen erzielt werden (χ^2 - Test).

Apparatur III

Diese Apparatur (Suppositorium unter einer Glasplatte) berücksichtigt die Spreitung der geschmolzenenen Suppositorienmasse. Im Gegensatz zur Apparatur I und II ist die Größe der Grenzfläche, die sich nach dem Aufschmelzen der Suppositorien ausbildet, nicht durch die Apparatur vorgegeben. Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen sind geringer als in der Apparatur II. Für die Testsuppositorien konnte keine befriedigende in vivo-/in vitro- Korrelation gefunden werden (Kap. 7.1). Die untersuchten Zielgrößen ließen in vitro eine andere Rangfolgen als in vivo erkennen. Die Handhabung der Apparatur ist aufwendig. Es bereitet einige Mühe, das Suppositorium unter einer Glasplatte zu arretieren, vor allem, wenn mehrere Versuche aus technischen Gründen (Mehrfachrührer) zeitlich parallel laufen müssen. Im geschmolzenen Zustand wird die Suppositorienmasse bereits durch geringste Erschütterungen oder Vibrationen unter der Glasplatte hervorgespült.

Apparatur IV

In der Durchflußzelle wird der Wirkstoff aus allen untersuchten Suppositorien schnell und fast vollständig freigesetzt. Die Freisetzungsgeschwindigkeiten sind in vivo und in vitro in etwa gleich groß. Reproduzierbarkeit und Differenzierungsvermögen der Apparatur entsprechen ungefähr der Apparatur I. Eine in vivo-/ in vitro-Rangkorrelation aufgrund der untersuchten Kenngrößen zeigt in vitro die gleiche Reihenfolge wie in vivo. Abweichend von den in vivo Versuchen wird in der Durchflußzelle Natriumbenzoat aus Witepsol H15 schneller freigesetzt als Benzoesäure. Der Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant (Kap. 6.2.5). Eine Verzögerung zu

Beginn der Freisetzung erschwert die in vivo-/ in vitro Korrelation. Dieser Vorgang hat aber nur einen Einfluß auf die Freisetzung des ersten Dezils (Kap. 7.3). Die Handhabung der Durchflußzelle ist schwieriger als die der anderen Apparaturen. Eine experimentelle Schwierigkeit, das Ausschwemmen von geschmolzener Suppositorienmasse, konnte nur durch eine Umkehrung der Strömungsrichtung (von oben in die Zelle), Glaskugeln in die das Suppositorium eingebettet wurde und durch eine geringere Durchströmungsgeschwindigkeit (5 ml/min.) vermieden werden.

Apparatur V

In der Apparatur V wird das Suppositorium in einem Dialyseschlauch von Akzeptormedium umströmt. Die Peristaltik des Rektums wird durch einen periodisch wechselnden Flüssigkeitsdruck simuliert. Die beobachteten Freisetzungsgeschwindigkeiten gleichen denen der Apparatur III. Der Verlauf der Freisetzungsgeschwindigkeit ist im Membranmodell aber deutlich gleichförmiger als in vivo. Bezüglich der Reproduzierbarkeit und des Differenzierungsvermögen ähnelt sie der Apparatur III. Bei den mittleren Verweilzeiten ergeben sich für die Apparatur eine deutliche Abweichung von der in vivo gefundenen Reihenfolge. Natriumbenzoat wird in dieser Apparatur aus Witepsol H15 signifikant schneller freigesetzt als Benzoesäure.
Die in vivo-/in vitro- Korrelation anhand von Kurvenverläufen zeigt ebenfalls, daß die Apparatur V den Unterschied in der Wasserlöslich-keit des Wirkstoffes gegenüber den in vivo Ergebnissen zu stark betont. Das Membranmodell hat gegenüber den anderen Apparaturen keine Vorteile, die die aufwendigere Versuchsdurchführung rechtfertigen würde.

8 Zusammenfassung

Das Freigabeverhalten von Suppositorien wurde in vivo und in vitro untersucht. Als Modellsubstanz für den Wirkstoff diente Benzoesäure bzw. ihr leicht lösliches Natrium-Salz. Die beiden verwendeten Hartfettgrundlagen (Witepsol H15 und Witepsol W35) unterschieden sich vor allem in der Hydroxylzahl. Bei der Herstellung und Temperung der Suppositorien wurde darauf geachtet, daß die physikalische Stabilität für den gesamten Zeitraum der in vivo- und in vitro- Versuche gewährleistet war.

Die in vivo-Untersuchungen wurden an fünf Probanden durchgeführt. Aus der Urinausscheidung wurde die Benzoesäure spektralphotometrisch bestimmmt. Das Resorptions- und/oder Freigabeverhalten der Suppositorien wurde aus den Ausscheidungskurven nach dem Wagner-Nelson Verfahren, über die numerische Dekonvolution (Trapezregel, nach Glättung der Daten und Interpolation durch Spline-Funktionen) und durch Kurvenanpassung bestimmt. Die nach der numerischen Dekonvolution erhaltenen Freiset-zungsverläufe wurden durch folgende Kenngrößen charakterisiert:

-freigesetzte Menge Arzneistoff (O. gewöhnliche Moment)
-mittlere Verweilzeit (1. gewöhnliches Moment)
-Varianz der Verweilzeiten (2. zentrales Moment)

Die einzelnen Kenngrößen wurden zunächst mit parameterfreien Verfahren untereinander verglichen. Durch lineare Diskriminanzanalyse wurden unter Berücksichtigung aller Kenngrößen Unterschiede zwischen den Formulierungen untersucht.

Die Urindaten ließen trotz der hohen Variabilität Unterschiede zwischen den Formulierungen erkennen. Nach der Applikation wurde im Versuchszeitraum aus Suppositorien, die mit Witepsol H15 hergestellt wurden, im Mittel mehr Wirkstoff freigesetzt als aus Suppositorien auf der Grundlage von Witepsol W35. Die Vollständigkeit der Bioverfügbarkeit hing nicht davon ab, ob die Testsubstanz in Form des Salzes oder der Säure eingesetzt wurde. Aus der Grundlage Witepsol H15 wird Benzoesäure schneller freigesetzt als Natriumbenzoat. Zur Untersuchung des Freisetzungsverhalten wurden fünf in der Literatur beschriebenene Apparaturen ausgewählt.

Die mit den Rührgefäßmethoden erhaltenen Freisetzungsverläufe sind deutlich langsamer als die in vivo-Freisetzung. Die Freisetzungsverläufe in vitro wurden ebenso wie die Freisetzungsverläufe in vivo durch statistischen Momente beschrieben, und über parameterfreie und diskriminazanalytische Methoden ausgewertet. Die Rührgefäßmethoden unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Differenzierungsvermögens, ihrer Reproduzierbarkeit und der Handhabung . Bei den Durchflußmethoden entspricht die beobachtete Freisetzungsgeschwindigkeit ungefähr den in vivo beobachteten Werten. Im Gegensatz zu den in vivo-Untersuchungen wird in ihnen Natriumbenzoat schneller als Benzoesäure freigesetzt.

In einer Freisetzungsapparatur mit Membran, war die Reproduzierbarkeit der Freisetzungsverläufe höher als bei anderen Geräten, gleichzeitig nahm aber das Differenzierungsvermögen ab.

Eine Rangkorrelation der in vivo und in vitro beobachteten Kenngrößen (z.B. mittlere Verweildauer) erbrachte für einige Apparaturen eine gegenüber den in vivo Ergebnissen veränderte Reihenfolge. Damit ließ sich nicht für alle Apparaturen eine lineare Abhängigkeit zwischen den in vivo und in vitro beobachteten mittleren Verweilzeiten nachweisen. Zusammenhänge zwischen den in vivo und in vitro beobachteten Freisetzungsverläufen einzelner Formulierungen wurden anhand der Zeitintervalle untersucht, in denen in vivo und in vitro konstante Dosisanteile (10%) freigesetzt wurden. Anschließend wurden die Zeitskalen der in vitro- Freisetzungsverläufe den in vivo- Verläufen angeglichen. Da die Flächen unter diesen Stufenfunktionen gleich sind, wurden sie wie Verteilungen behandelt und durch den χ^2 Test auf Äquivalenz überprüft. Dabei zeigte sich, daß die Freisetzungsgeschwindigkeit einer Apparatur keinen Einfluß auf die Güte der in vivo-/in vitro-Korrelation hat.

Bei allen Freisetzungsapparaturen hat die Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes einen größeren Einfluß auf die Freisetzung in vitro als in vivo. Es war deshalb nicht möglich, durch einen einzigen lineare Transformation der Zeitbasis die Apparaturen so zu normieren, daß in vivo- und in vitro- Freisetzungsverläufe für alle Formulierungen deckungsgleich wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß in vitro erhaltene Freigabeverläufe in einer nachweisbaren Beziehung zu den in vivo-Befunden bestehen. Gleichzeitig müssen aber auch im Rahmen der in vivo-/in vitro-Korrelation die in vitro-Ergebnisse kritisch gewertet werden.
Die hohe biologische Variabilität und die nur unter bestimmten Voraussetzungen zulässigen Methoden zur Rekonstruktion der in vitro-Freisetzung, begrenzen die Möglichkeiten der in vivo-/in vitro Korrelation.
Für weitere Arbeiten bleiben noch interessante Fragen offen, die zum Teil genauere physiologische Kenntnisse des Rektums voraussetzen. Verbesserte Methoden zur Rekonstruktion der in vivo Freisetzungs- und Resorptionsverläufe könnten bei galenischen Fragestellungen (z.B. Pufferung der Wirkstoffe, Spreitung der Grundlage, resorptionserhöhende Hilfsstoffe) eine wesentliche Hilfe darstellen. Durch weitergehende statistische Auswertungsmethoden könnten biologische Vorgänge vollständiger quantifiziert und Sicherheit der Aussagen gesteigert werden.

Apparatur I

Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure
im Sammelintervall

Intervall-mitte (Min.)	Suppositorium NH15 (%/Min.)		Suppositorium BH15 (%/Min.)		Suppositorium NW35 (%/Min.)		Suppositorium BW35 (%/Min.)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
2,5	0,711	0,250	0,548	0,106	0,629	0,371	0,73	0,380
7,5	0,234	0,145	0,422	0,316	0,134	0,266	0,218	0,230
15,0	0,329	0,110	0,402	0,179	0,055	0,100	0,227	0,279
25,0	0,366	0,130	0,569	0,193	0,155	0,086	0,34	0,196
35,0	0,461	0,219	0,620	0,170	0,153	0,095	0,368	0,099
45,0	0,388	0,159	0,706	0,313	0,131	0,066	0,261	0,131
55,0	0,378	0,208	0,644	0,120	0,153	0,070	0,289	0,154
70,0	0,278	0,160	0,593	0,194	0,125	0,045	0,133	0,570
90,0	0,174	0,138	0,362	0,172	0,142	0,025	0,102	0,060
110,0	0,375	0,147	0,356	0,172	0,120	0,055	0,099	0,051
135,0	0,192	0,081	0,168	0,077	0,123	0,035	0,092	0,056
165,0	0,152	0,091	0,170	0,067	0,089	0,044	0,063	0,059
195,0	0,131	0,069	0,211	0,066	0,095	0,022	0,47	0,072
225,0	0,118	0,094	0,076	0,097	0,018	0,099	0,047	0,064
255,0	0,088	0,028	0,103	0,129	0,082	0,055	0,055	0,042
285,0	0,037	0,049	0,071	0,149	0,115	0,076	0,042	0,041
315,0	0,068	0,083	0,040	0,049	0,102	0,040	0,038	0,049
345,0	0,076	0,059	0,052	0,079	0,049	0,042	0,036	0,035
375,0	0,076	0,046	0,043	0,011	0,106	0,082	0,060	0,045
M [%]	68,4	8,32	89,5	6,00	46,5	6,03	40,3	6,94
$\bar{t}$ [h]	3,26	1,05	1,44	0,60	8,02	1,24	7,81	1,21
Var [h]	9,67	7,56	1,07	0,18	37,8	7,38	43,8	15,7

ApparaturII

Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure im Sammelintervall

Intervall-mitte (Min.)	Suppositorium NH15 (%/Min.)		Suppositorium BH15 (%/Min.)		Suppositorium NW35 (%/Min.)		Suppositorium BW35 (%/Min.)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
2,5	1,151	0,415	1,592	0,686	0,466	0,225	1,133	0,194
7,5	1,150	0,500	1,528	0,824	0,182	0,116	1,012	0,472
15,0	1,050	0,135	1,632	0,491	0,249	0,232	0,583	0,529
25,0	0,685	0,058	0,910	0,370	0,277	0,211	0,631	0,457
35,0	0,533	0,044	0,845	0,484	0,170	0,040	0,617	0,575
45,0	0,693	0,300	0,400	0,231	0,158	0,061	0,297	0,220
55,0	0,474	0,241	0,314	0,198	0,185	0,016	0,625	0,275
70,0	0,355	0,084	0,299	0,105	0,143	0,056	0,314	0,109
90,0	0,280	0,112	0,272	0,115	0,163	0,059	0,263	0,147
110,0	0,256	0,162	0,161	0,100	0,301	0,140	0,283	0,199
135,0	0,143	0,029	0,187	0,087	0,204	0,111	0,254	0,183
165,0	0,101	0,057	0,125	0,076	0,254	0,110	0,160	0,104
195,0	0,149	0,082	0,077	0,058	0,206	0,121	0,244	0,125
225,0	0,114	0,072	0,076	0,057	0,181	0,124	0,140	0,125
255,0	0,066	0,055	0,067	0,043	0,135	0,028	0,118	0,127
285,0	0,023	0,027	0,038	0,058	0,124	0,065	0,047	0,043
315,0	0,065	0,054	0,066	0,042	0,161	0,099	0,137	0,134
345,0	0,0004	0,037	0,029	0,048	0,102	0,047	0,055	0,095
375,0	0,025	0,067	0,057	0,050	0,048	0,147	0,015	0,052
M [%]	84,1	2,66	92,9	3,52	68,6	9,37	90,8	5,73
$\bar{t}$ [h]	1,23	0,13	0,81	0,15	3,41	0,53	1,55	0,87
Var. [h²]	1,32	0,37	0,62	0,27	4,63	1,81	1,33	1,10

Apparatur III
Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure
im Sammelintervall

Intervall-mitte (Min.)	Suppositorium NH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium NW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s
2,5	0,911	0,138	0,975	0,365	0,402	0,170	0,422	0,311
7,5	0,365	0,339	0,439	0,245	0,217	0,229	0,130	0,268
15,0	0,399	0,244	0,421	0,291	0,034	0,074	0,203	0,163
25,0	0,623	0,520	0,680	0,122	0,119	0,093	0,602	0,460
35,0	0,787	0,332	0,689	0,141	0,144	0,158	0,645	0,245
45,0	0,719	0,256	0,654	0,184	0,160	0,124	1,306	1,437
55,0	0,666	0,460	0,475	0,194	0,153	0,071	0,932	0,577
70,0	0,430	0,286	0,552	0,085	0,125	0,030	0,450	0,307
90,0	0,412	0,171	0,402	0,044	0,145	0,057	0,318	0,269
110,0	0,250	0,122	0,359	0,102	0,139	0,051	0,434	0,353
135,0	0,246	0,123	0,315	0,059	0,113	0,024	0,233	0,193
165,0	0,091	0,066	0,202	0,080	0,117	0,049	0,127	0,138
195,0	0,160	0,134	0,142	0,033	0,163	0,086	0,025	0,081
225,0	0,088	0,116	0,116	0,100	0,149	0,054	0,114	0,095
255,0	0,079	0,080	0,162	0,084	0,182	0,089	0,066	0,061
285,0	0,070	0,103	0,029	0,031	0,088	0,052	0,030	0,061
315,0	0,074	0,083	0,066	0,099	0,074	0,082	0,104	0,185
345,0	0,010	0,023	0,020	0,086	0,094	0,058	0,057	0,105
375,0	0,048	0,099	0,038	0,069	0,113	0,062	0,045	0,062
M [%]	86,1	4,11	95,8	3,03	51,16	4,85	87,85	4,25
$\bar{t}$ [h]	1,45	0,44	1,27	0,14	6,06	0,81	1,46	0,66
Var [h²]	1,37	1,07	0,72	0,09	13,25	11,3	0,98	0,86

Apparatur IV
Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure
im Sammelintervall

Intervall-mitte (Min.)	Suppositorium NH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium NW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s
5,0	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000
10,0	0,266	0,133	0,219	0,084	0,197	0,162	0,272	0,167
20,0	0,902	0,640	0,195	0,054	1,053	0,725	0,720	0,371
30,0	2,119	0,444	0,421	0,233	1,900	0,273	1,465	0,592
40,0	1,780	0,606	0,454	0,101	0,957	0,447	1,506	0,180
50,0	1,396	0,636	0,364	0,099	0,529	0,090	1,309	0,310
60,0	0,771	0,281	0,313	0,082	0,390	0,028	0,992	0,324
80,0	0,356	0,151	0,360	0,140	0,258	0,043	0,670	0,250
100,0	0,199	0,069	0,435	0,158	0,184	0,052	0,304	0,140
120,0	0,125	0,054	0,329	0,158	0,143	0,038	0,228	0,220
150,0	0,098	0,064	0,446	0,214	0,130	0,028	0,103	0,070
180,0	0,059	0,063	0,313	0,176	0,122	0,066	0,086	0,061
210,0	0,040	0,050	0,251	0,162	0,066	0,042	0,067	0,047
240,0	0,034	0,052	0,225	0,170	0,058	0,046	0,042	0,024
270,0	0,033	0,056	0,110	0,083	0,049	0,041	0,029	0,025
300,0	0,023	0,044	0,078	0,071	0,034	0,031	0,015	0,001
330,0	0,021	0,036	0,024	0,036	0,21	0,020	0,009	0,010
360,0	0,000	0,000	0,005	0,015	0,004	0,011	0,000	0,000
390,0	0,000	0,000	0,001	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
420,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
M [%]	100,3	4,53	101,3	4,48	87,9	7,84	78,6	2,47
$\bar{t}$ [h]	0,77	0,28	0,84	0,19	2,14	0,47	1,39	0,25
Var [h²]	0,21	0,37	0,14	0,1	1,65	1,57	1,99	0,64

Apparatur V
Freisetzungsgeschwindigkeit von Benzoesäure
im Sammelintervall

Intervallmitte (Min.)	Suppositorium NH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BH15 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium NW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s	Suppositorium BW35 (%/Min.) $\bar{x}$	s
2,5	1,537	0,645	1,559	0,603	1,057	0,313	1,166	0,531
7,5	0,030	0,057	0,048	0,614	0,141	0,243	0,279	0,549
15,0	0,439	0,450	0,125	0,164	0,057	0,066	0,022	0,055
25,0	0,734	0,208	0,467	0,282	0,318	0,291	0,157	0,146
35,0	0,713	0,219	0,451	0,097	0,511	0,260	0,169	0,071
45,0	0,882	0,187	0,419	0,146	0,467	0,307	0,205	0,084
55,0	0,658	0,285	0,481	0,071	0,595	0,165	0,190	0,153
70,0	0,537	0,175	0,337	0,087	0,457	0,121	0,219	0,098
90,0	0,459	0,139	0,455	0,167	0,455	0,093	0,315	0,112
110,0	0,431	0,103	0,293	0,124	0,449	0,145	0,293	0,059
135,0	0,197	0,106	0,346	0,075	0,318	0,042	0,263	0,029
165,0	0,114	0,037	0,268	0,054	0,333	0,089	0,341	0,055
195,0	0,166	0,132	0,236	0,098	0,198	0,063	0,248	0,096
225,0	0,091	0,095	0,217	0,056	0,122	0,040	0,181	0,045
255,0	0,049	0,036	0,194	0,08	0,095	0,082	0,24	0,105
285,0	0,030	0,073	0,148	0,085	0,098	0,053	0,304	0,034
315,0	0,034	0,049	0,128	0,098	0,008	0,053	0,155	0,064
345,0	0,045	0,081	0,049	0,041	0,060	0,068	0,102	0,049
375,0	0,030	0,061	0,054	0,061	0,030	0,055	0,120	0,037
M [%]	94,1	2,42	95,8	5,11	88,59	4,56	90,26	6,42
$\bar{t}$ [h]	1,11	0,23	1,73	0,28	2,77	0,30	1,74	0,47
Var [h²]	0,59	0,14	1,23	0,29	2,30	0,44	0,91	0,37

Proband: A

mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid}

Anhang B

Klysma Vol: 9,0 ml		Suppositorium NH Supp. Gew. 2.1920		Suppositorium BH Supp. Gew. 2.1580		Suppositorium NW Supp. Gew. 2.2000		Suppositorium BW Supp. Gew. 2.1890	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	0.6825	7.50	0.4348	7.50	0.2339	7.50	0.1163	6.00	0.4875
22.50	1.6840	22.50	0.9662	22.50	1.8648	22.50	0.2487	19.50	0.3765
37.50	2.6344	37.50	1.6098	37.50	2.0996	37.50	1.2871	34.50	1.2018
52.50	1.6887	52.50	1.7906	52.50	1.9262	52.50	1.4415	49.50	1.2189
67.50	1.2501	67.50	1.4517	67.50	1.6702	67.50	1.1231	64.50	0.9174
82.50	0.8731	82.50	1.1922	82.50	1.1750	82.50	0.9681	80.00	1.1581
97.50	0.8216	97.50	1.2221	98.50	1.0944	97.50	1.0477	95.00	0.9713
112.50	0.5243	112.50	0.6146	113.50	0.6774	112.50	1.3347	110.00	0.7060
135.00	0.3771	135.00	0.6176	135.00	0.4604	135.00	0.9603	133.00	0.6519
165.00	0.3280	165.00	0.3755	165.00	0.0649	165.00	0.4924	162.50	0.3340
195.00	0.1250	195.00	0.0838	195.00	0.1489	195.00	-.0327	192.50	0.3664
225.00	-.0440	225.00	0.0612	225.00	0.0878	225.00	-.0070	221.50	0.1655
240.00	0.0000	255.00	-.0362	255.00	-.0519	255.00	-.0406	251.50	0.0306
		285.00	0.0368	285.00	0.0668	285.00	-.1677	283.00	-.0198
				315.00	-.0513	300.00	0.0327	313.50	-.0133
				342.50	-.0803			344.00	-.0211
				355.00	0.0000				

Proband: D mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid} Anhang B

Klysma		Suppositorium NH		Suppositorium BH		Suppositorium NW		Suppositorium BW	
Vol: 10,0 ml		Supp. Gew. 2.1953		Supp. Gew. 2.1700		Supp. Gew. 2.1660		Supp. Gew. 2.1620	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	0.8888	8.00	0.4816	6.50	1.0109	7.50	0.4189	7.50	0.4092
27.00	2.4789	21.50	1.3769	20.50	1.6741	22.50	1.3082	22.50	1.5112
44.00	4.1267	35.00	1.8116	35.50	2.9798	37.00	1.1909	37.50	1.7093
56.50	1.3217	50.00	1.8034	50.50	1.5551	52.00	1.1538	52.50	1.0537
71.50	0.8600	65.00	1.7784	65.50	1.6953	67.50	1.2421	67.50	1.0370
86.50	0.9881	81.50	1.6927	80.50	1.2116	83.50	0.5631	82.50	0.9392
101.50	0.5724	96.50	1.3154	95.50	0.4081	98.00	0.3944	97.50	0.7928
119.00	0.2746	110.00	1.2504	112.00	0.6694	112.50	0.3163	114.00	0.5885
138.00	-.0605	132.00	0.7406	135.00	0.4014	135.00	0.4148	136.50	0.2186
164.00	-.0131	162.50	0.3800	163.50	-.0514	164.00	0.3307	165.00	0.1633
196.00	0.0069	193.00	0.2292	188.50	0.3356	193.50	0.1642	195.00	0.1728
225.50	0.0173	223.50	0.1049	209.50	0.0073	224.00	0.0359	225.00	0.1196
258.00	-.0073	254.50	0.0094	230.50	-.0529	255.50	0.0566	255.00	0.0251
276.00	0.0000	285.00	-.0016	241.00	0.0000	286.00	-.0136	285.00	0.0401
		314.00	0.0149			316.00	0.0479	300.00	0.0000
						346.00	0.0686		
						361.00	0.0000		

Proband: E

mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid}.

Klysma		Suppositorium NH		Suppositorium BH		Suppositorium NW		Suppositorium BW	
Vol: 17,7 ml		Supp. Gew. 2.1954		Supp. Gew. 2.1511		Supp. Gew. 2.2000		Supp. Gew. 2.1800	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	0.7602	7.50	0.4112	7.50	0.3403	7.50	0.0012	7.50	0.3299
22.50	2.9935	22.50	0.4591	22.50	1.7523	22.50	0.2329	22.50	0.4842
37.50	2.4939	37.50	0.7355	37.50	1.5011	37.50	0.2343	37.50	0.3609
52.50	1.9247	52.50	0.7202	52.50	1.4275	52.50	0.6773	52.50	0.7021
68.50	1.6571	67.50	1.1835	68.50	1.4015	67.50	0.7199	67.50	1.3226
84.00	1.3876	82.50	1.5093	84.50	0.8960	82.50	0.7123	82.50	0.5472
98.00	1.4207	97.50	1.3972	99.00	0.6284	98.50	0.6444	97.50	0.6174
112.50	1.0273	112.50	1.2579	113.00	0.8644	117.50	0.7392	112.50	0.5799
135.00	0.9992	138.50	1.1844	136.50	0.4561	139.00	0.8882	135.00	0.4512
165.00	0.7339	169.50	0.5084	166.50	0.4104	165.00	0.5496	165.00	0.4589
195.00	0.4363	197.00	0.2165	195.00	0.2063	196.00	0.2617	195.00	0.5538
225.00	0.2989	231.00	0.5444	225.00	0.1773	226.00	0.2107	225.00	0.5692
255.00	0.1144	262.50	0.4952	255.00	0.2013	255.50	0.0997	255.00	0.2585
285.00	0.1288	287.50	0.3366	285.00	-.0210	286.50	0.1130	285.00	0.1856
315.00	-.0665	315.50	0.2665	315.00	-.0331	318.50	0.2589	315.00	0.2914
345.00	-.0714	345.50	-.1007	345.00	-.0156	348.50	-.1271		
				360.00	0.0000				

Proband: E mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid}

Klysma		Suppositorium NH		Suppositorium BH		Suppositorium NW		Suppositorium BW	
Vol: 11,9 ml		Supp. Gew. 2.1699		Supp. Gew. 2.1880		Supp. Gew. 2.1891		Supp. Gew. 2.1904	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	0.8294	7.50	0.8604	7.50	0.5476	7.50	0.4485	7.50	0.1044
22.50	1.4255	22.50	0.8922	22.50	1.3703	22.50	0.3730	22.50	1.3666
37.50	1.8783	37.50	0.6978	37.50	1.0699	37.50	1.0242	37.50	2.0521
52.50	1.5891	52.50	0.8062	52.50	1.2895	52.50	0.8741	52.50	1.3912
67.50	0.9878	67.50	0.8099	67.50	1.0120	67.50	0.8757	67.50	0.6843
82.50	0.8278	82.50	0.9147	82.50	1.1231	82.50	0.7203	82.50	0.8356
97.50	0.8561	97.50	0.7449	97.50	1.2349	97.50	0.9404	97.50	0.3563
112.50	0.7885	112.50	0.7908	112.50	0.9714	112.50	0.3818	112.50	0.3781
127.50	0.7017	127.50	0.9084	127.50	1.2280	127.50	0.3885	127.50	0.0605
142.50	0.7847	142.50	0.8112	142.50	0.8207	142.50	0.5789	142.50	0.1421
157.50	1.0311	157.50	0.9361	157.50	1.0847	157.50	0.5488	157.50	0.0722
172.50	0.6088	172.50	0.9606	172.50	1.0591	172.50	0.4332	172.50	0.4344
187.50	0.7376	187.50	0.3940	187.50	0.8675	187.50	0.3736	187.50	0.1837
202.50	0.7066	202.50	0.6029	202.50	0.5465	202.50	0.0973	202.50	0.2108
217.50	0.7983	217.50	0.3963	217.50	0.4093	217.50	0.2363	217.50	0.1590
232.50	0.4416	232.50	0.5242	232.50	0.6363	232.50	0.0178	232.50	0.0270
255.00	0.1085	255.00	0.3331	255.00	0.1513	255.00	0.5303	247.50	0.2256
270.00	0.0000	285.00	0.1808	270.00	0.0000	285.00	0.2773	270.00	0.1435
		330.00	-.0731			300.00	0.0000	300.00	0.3602
		390.00	-.0534					345.00	-.0753

Proband: E mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid} Anhang B

Klysma		Suppositorium NH		Suppositorium BH		Suppositorium NW		Suppositorium BW	
Vol: 7,5 ml		Supp. Gew. 2.1850		Supp. Gew. 2.1480		Supp. Gew. 2.1520		Supp. Gew. 2.1550	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	1.0310	7.50	0.0448	7.50	0.2621	7.50	0.1595	7.50	0.2019
22.50	1.7976	22.50	0.2683	22.50	1.8795	22.50	0.2723	22.50	1.2417
37.50	1.4787	37.50	0.8682	37.50	1.6933	37.50	0.2723	37.50	1.8077
52.50	1.6850	52.50	1.6691	52.50	1.8750	52.50	0.4176	53.00	1.5733
67.50	1.1777	67.50	0.9003	67.50	1.4730	67.50	0.3337	68.50	0.9812
84.00	0.6080	82.50	1.1701	82.50	0.9234	82.50	0.4968	83.00	1.0248
99.00	0.6130	97.50	1.1465	97.50	0.8895	97.50	0.7997	97.50	0.5039
112.50	0.4353	112.50	0.9638	112.50	0.8918	112.50	0.5381	112.50	0.4718
135.00	0.1091	135.00	0.6334	135.00	0.3415	135.00	0.5516	135.00	0.3881
165.00	0.1069	165.00	0.4476	165.00	0.1559	165.00	0.3110	165.00	0.2528
196.50	0.1003	195.00	0.4917	195.00	0.3842	195.00	0.3980	195.00	0.3006
226.50	0.0876	221.36	0.4562	225.00	0.0484	225.00	0.3585	225.00	0.1902
255.00	0.0871	232.73	0.0000	255.00	-.0697	255.00	0.1581	255.00	0.0957
285.00	0.0756			285.00	-.0564	270.00	0.0000	285.00	0.0242
300.00	0.0000			300.00	0.0235			300.00	0.0000

Proband:C mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid} Anhang B

Klysma		Suppositorium NH		Suppositorium BH	
Vol: 9.1 ml		Supp. Gew. 2.2034		Supp. Gew. 2.1686	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	1.3693	7.50	0.0555	7.50	0.3156
22.50	2.7202	22.50	0.8503	22.50	1.8180
37.50	1.8014	37.50	1.1493	37.50	2.1841
52.50	1.5017	52.50	1.0837	52.50	2.0797
67.50	0.8973	67.50	1.1536	67.50	1.5783
82.50	0.5111	82.50	1.1493	82.50	1.1410
97.50	0.4639	97.50	0.8350	97.50	0.5830
112.50	0.3353	112.50	0.9081	112.50	0.4422
135.00	0.2363	135.00	0.6397	135.00	0.3943
165.00	0.0880	165.00	0.5648	165.00	0.1685
195.00	-.0126	195.00	0.3807	195.00	0.2049
225.00	0.0066	225.00	0.1540	225.00	0.0180
255.00	0.0380	255.00	0.1190	255.00	0.0000
270.00	0.0000	285.00	0.0702	285.00	0.0826
		315.00	0.0681		
		345.00	0.0555		

Proband:B. mittlere Ausscheidungsgeschwindigkeit von Benzoesäure in den Urinsammelintervallen t_{mid} Anhang B

Klysma		Suppositorium NW		Suppositorium BW	
Vol: 9,8 ml		Supp. Gew. 2.1820		Supp. Gew. 2.1561	
(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)	(Min)	(mg/ml)
7.50	0.3417	7.50	0.0955	15.00	0.3122
22.50	2.2658	22.50	0.1251	41.50	1.2672
37.50	1.4468	37.50	0.3313	59.50	1.0254
52.50	1.2484	52.50	0.3851	73.50	0.9368
67.50	0.8814	67.50	0.5066	88.50	0.8603
82.50	0.6151	82.50	0.8097	103.50	0.6550
97.50	0.5866	97.50	0.6170	115.50	1.2201
112.50	0.5695	112.50	0.4611	127.50	0.3636
135.00	0.7479	135.00	0.6079	150.00	0.3771
165.00	0.3732	165.00	0.3467	180.00	0.4256
195.00	0.2418	195.00	0.1757	210.00	0.3253
225.00	0.1362	225.00	0.1586	240.00	0.1387
255.00	0.0199	255.00	0.1370	270.00	0.1116
270.00	0.0000	285.00	0.0542	285.00	0.0000
		315.00	-.0433		
		345.00	-.0742		

Anhang C: Symbole

$A_I(t)$	Ausgangsfunktion nach Impuls
$A_S(t)$	Ausgangsfunktion nach Signal
α	Wahrscheinlichkeit eines statistischen Fehlers 1.Art
b_i	i-te Konstante der Diskriminanzanalyse
BH	Benzoesäure in Witepsol H15
BP	British Pharmacopoeia, Ausgabe 1980
BW	Benzoesäure in Witepsol W35
^oC	Grad Celsius
cP	centi Poise
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex, Ausgabe 1983
d	Differenz der Trennwerte
Δ_i	Dezilendifferenz
E	Ausgeschiedene Wirkstoffmenge
F_A	Auflösungskurve A
F_{rel}	relative Bioverfügbarkeit
G(t)	Systemfunktion
H	Prüfgröße des Kruskal-Wallis Test
H_h	harmonisches Mittel
h	Stunde
I(t)	Impulsfunktion
K	Arzneistoffmenge im Körper
k_e	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
M	insgesammt freigesetzte Masse
M_{390}	nach 390 Minuten freigesetzte Masse
min	Minuten
n	Zahl der Meßwerte
NH	Benzoesäure in Witepsol H15
NW	Benzoesäure in Witepsol W35
m_r	statistisches Moment r-ter Ordnung
p_i	beobachtung der i ten Meßreihe
R	Arzneistoffmenge im Rektum
R_i	Rang der i-ten Meßreihe
$R_{i.}$	Summe der Ränge der i-tem Meßreihe

s	Standardabweichung
$S(t)$	Eingangsfunktion
θ	Verschiebungsparameter
T^+	Summe der positiven Rangzahlen
$\bar{t}$	mittlere Verweilzeit
$\bar{t}_{80\%}$	mittlere Verweilzeit für 80% der eingesetzten Dosis
t_{mid}	Mitte des Sammelintervalls
$t_{\Delta i}$	Zeit, die zur Freisetzung eines Dosisquantils benötigt wird
$\bar{t}_{sys}$	mittlere Verweilzeit nach der Freisetzung im Körper
$\bar{t}_{dis}$	mittlere Verweilzeit des Arzneistoffes in der Arzneiform
$\bar{t}_{tot}$	mittlere Verweilzeit im Gesamtsystem
U	Arzneistoffmenge im Urin
$v_{\Delta i}$	Geschwindigkeit mit der ein Dosisdezil freigesetzt wird
Var_t	Varianz der Verweilzeiten
$Var_{t80\%}$	Varianz der verweilzeiten für 80% der eingesetzten Dosis
X	Trennmaß
x_i	Zielgröße der i-ten Meßreihe
$\bar{X}$	Mittelwert der Trennwerte
ξ	Dezil
z_i	i-te Differenz zwischen den Zubereitungen

Literatur

1) United States Pharmacopoeia, 21st Edition, Rockville Md., 1984
2) British Pharmacopoeia, University Press, Cambridge, 1980
3) H.L.M.Cox, D.D.Breimer ,FIP-Kongreß Stockholm, 1973 (zitiert nach 31)
4) A.J.M. Schoonen et al., Pharm.Weekblad, 3, 589, 1976
5) J.Meier, H.Rettig, H.Hess, Biopharmazie, Thieme 1981
6) H.W. Dibbern, Pharm.Ind., 46, 381, 1984
7) H.Möller, Pharm.Ind., 46, 514, 1984
8) J.J.Tukker, Disertation, Universität Utrecht, 1983
9) Deutsches Arzneibuch, Govy Verlag, 8. Ausg., Stuttgart, 1978
10) A.G.de Boer, et al., Pharm. Weekblad, 1, 128, 1979
11) K.Thoma et al., Arzneiformen zur rektalen und vaginalen Applikation, Frankfurt am Main 1980
12) A.Moes, Sci.Techn.pharm., 6,263,1980
13) M.Eckert, Dissertation, Universität München 1982
14) M.Bornschei et al., Pharmazie 35, 772, 1980
15) P.Serno, Dissertation, Universität München, 1982
16) F.W.Obereichholz-Bangert, Dissertation, Universität Bonn, 1982
17) W.Hennig, Dissertation, Universität Mainz, 1959
18) F.Neuwald, F.Kunze, Arzneim.Forsch., 9, 1029, 1964
19) F.Neuwald, F.Kunze, Arzneim.Forsch., 10, 1162, 1964
20) V.E.Krogerus, M.Tolvi, Acta Pharmaceutica Suecica, 2, 327, 1965
21) EuropEEsches Arzeibuch, Ed.II., Maisonneuve S.A., Sainte-Russine, Frankreich 1980
22) Österreichisches Arzneibuch, 9.Ausgabe, Wien 1981
23) Pharmacopoea Helvetica, VI, Zürich, 1971
24) K.Thoma, P.Serno, Pharm.Zeitung, 18, 980, 1982
25) J.Büchi, P.Oesch, Pharmac.Act.Helvet., 20 , 129, 1945 (zitiert nach 8)
26) I.Setnikar, S.Fantelli, J.Pharm.Sci., 52, 38, 1963
27) L.Krowczynski, Acta Poloniae Pharm., 1, XIX, 1962
28) Pharmacopoea Hungarica, Ed.VI., Medicina, Budapest 1967
29) Pharmacopoea Bohemoslovacica, Ed. III., Prag 1970

30) Pharmocopoea Rossica, Ed. X., Moskau
31) R.Süverkrüp, Acta Pharm.Technol., 26,143,1980
31) K.B.M.Bevernage, J.Polderman, Pharm. Weekblad, 108, 429, 1973
32) C.Wolf, R.Voigt, Pharmazie, 23, 345, 1968
33) H.J.Langmaack, Die Krankenhausapotheke 29, 90, 1980
34) W.A.Ritschel, M.Banarer, Arzneim.Forsch., 23, 1031 ,1973
35) E.Porges, B.Schade, W.Rapte, Pharm.Ind., 47, 77, 1985
36) G.Kedvessy, G:Mezey, Pharm.Ind., 29, 313, 1967
37) Henkel & Cie, Gmbh, Düsseldorf, Firmenmitteilung
38) C.J.Blaey De, J.J.Rutten-Kingma, Pharm.Acta.Helv., 52, 11, 1977
39) A.G.G. Stuuman-Bieze et al., Pharm.Weekblad 2, 1680, 1980
40) A.G.G. Stuuman-Bieze et al., Int. J. Pharm. 1, 337, 1980
41) Deutscher Arzneimittel Codex, 3.Ergänzung, Frankfurt, Stuttgart, 1983
42) J.Posti, P.Speiser, J.Pharm.Sci., 3, 101, 1980
43) H.Möller, Pharm.Ind., 45, 617, 1983
44) T.J.Roseman et al., J.Pharm.Sci., 70, 617, 1983
45) A.Del Pozo, Galenica Acta, (Madrid), 6, 92, 1953
46) J.Cemeli, A.Del Pozo, Galenica Acta, (Madrid), 7, 250, 1953
47) A.Kassem et al. Pharmazie 30, 472, 1975
48) H.P.M. Kerckhoffs, T.Huiziga, Pharm.Weekblad, 102, 1183, 1967
49) J.J.Tukker et al., Pharm.Weekblad, 3, 221, 1981
50) T.G Mc Cormack, J.Pharm.Pharmac. 23, 490, 1971
51) G.T.Tukker, Acta Pharm.Technol., 29,159,1983
52) H.M.Hattingberg von et al., Acta.Pharm.Technol., 29, 159, 1983
53) H.Stricker, Acta Pharm.Technol., 30(1), 5, 1985
54) D.Brockmeier, H.M.Hattingberg, Arzneim.Frsch., 32, 248, 1982
55) D.Brockmeier et al., Arzneim.Forsch. 33, 598, 1983
56) A.Gouyette, Arzeim.Forsch. 33,173, 1983
57) D.Vögele et al., Postervortrag, Jahreskogreß der APV, Mainz 1984
58) J.G.Wagner, E.Nelson, J.Pharm.Sci., 57, 610, 1963
59) J.G.Wagner, J.Pharmacokin. Biopharm., 3, 51, 1975
60) F.Langenbucher, Pharm. Ind. 44, 1166, 82
61) D.P.Vaugham, M.Dennis, J.Phar.Sci., 67, 663, 1978

62) E.Stepanek, Praktische Analyse linearer Systeme durch Faltungsoperationen, Akademische Verlagsgselschaft Geest & Portig K.G., Leipzig 1976
63) C.Boor de, A Practical Guide to Splines, Springer 1978, New York
64) K.Böhmer, Spline Funktionen, B.G.Teubner, Stuttgart 1979
65) R.Süverkrüp, J.Pharm.Sci., 68, 1395, 1979
66) R.Süverkrüp, J.Pharm.Sci., 74, 136, 1985
67) L.Z.Benet, J.Pharm.Sci., 61, 536, 1972
68) G.Bozler et al., Arzneim.Forsch. 27(I), 897, 1977
69) H.Boxenbaum, Pharm. Research, 2, 82, 1983
70) H.Boxenbaum et al., J.Pharmacokin.Biopharm., 2, 123, 1974
71) G.Heimann, F.Neuwald, E.Gladtke, Arzneim.Forsch., 28, 1023, 1976
72) A.Abd Elbary et al., Pharm.Ind. 45, 87, 1983
73) E.Minkow et al., Pharmazie, 39, 242, 1984
74) F.Moolenaar et al., Int.J.Pharm., 1, 323, 1978
75) A.J. Quick, Am.J.Med.Sci., 185, 630, 1933
76) K.Diem, C.Lentner, Scientific Tabls, 7.Aufl., Documenta Geigy, New-York, Basel, 1975
77) Pharmazeutische Stoffliste, 6.Aufl., ABDA, Frankfurt, 1984
78) W.M.Böttger et al., J.Pharm.Sci., 73, 95, 1984
79) Martin, Swarbrick, Cammarata, Physikalische Pharmazie,2.Aufl., Stuttgart, 1980
80) Suppositorienmassen, Firmenschrift, Dynamit Nobel AG, Troisdorf, 1976
81) K.Kakemi, K.Arita, T.Muranishi, Chem.Pharm.Bull., 13, 861, 1965
82) G.Redgon Dt.Apoth.Ztg, 35, 1280, 1976
83) T.Eckert et al., Pharm. Ind. 44, 622, 1982
84) T.Eckert et al., Pharm.Ind. 44, 927, 1982
85) Visking-Dialysierschlauch, Firmenmitteilung, Serva, Heidelberg 1983
86) H.Dibbern, UV- und IR- Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe, Editio Cantor, Aulendorf
87) E.Weber, Grundriss der biologischen Statistik, Gustav Fischer verlag, Stuttgart, 1967, 6.Auflage

88) M.Hollander, A.Wolfe, Nonparametric Statistical Methods, John Wiley & Sons, New York 1973
89) J.Hartung, Statistik, R.Oldenbourg Verlag, München,1982
90) A.Lindner, Statistische Methoden, 1.Aufl., Birkhäuser Verlag Basel,Stuttgart, 1967
91) J.Vollmer, Biometrie in der chemisch-pharmazeutischen Industrie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1983
92) G.Levy, Arch.Int.Pharmacodyn., 152, 59, 1964
93) G.Retzlaff, G.Rust, J.Waibel, Statistische Versuchsplanung, Verlag Chemie, Weinheim 1975

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1982 am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn begonnen und im April 1984 beendet.

Herrn Privatdozent Dr. R. Süverkrüp, auf dessen Anregung und unter dessen Leitung die Arbeit entstand, danke ich herzlich für die stets gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für seine ständige Bereitschaft, über theoretische und praktische Probleme zu diskutieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Müller, Direktor des Institutes für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn, für die Förderung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Apotheker Jörg Neuhaus und Herrn Diplom-Informatiker Markus Casper für die Hilfe und Anregungen beim Umgang mit der Rechenanlage sowie allen anderen Kollegen und Angestellten des Institutes für die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe, die sie mir bei verschiedenen Fragen gewährt haben.

Meine akademischen Lehrer waren die Herrn Professoren

Blaschke, Fickentscher, Frahm, Glombitza, Kalbhen, Karzel, Kating, Müller, Pachaly, Röder, Rücker, Tinapp, Wiedemann

Lebenslauf

Name	Thomas Klumpp
Geburtsdatum	10.03.57
Geburtsort	Fulda
Eltern	Helmut Klumpp, Diplom Handelslehrer Kreszensia Klumpp, geb. Heinz, Hausfrau
Familienstand	ledig
Schulbildung	1963-1965 Grundschule Bad Brückenau 1965-1967 Grundschule Brühl Vochem 1967-1976 Max Ernst Gymnasium Brühl
Abitur	26.06.76
Bundeswehr	1976 - 1977 Wehrpflicht, Luftwaffensanitätsdienst
Studium	WS 1977/78 Pharmazie in Bonn 24.08.79 1.Abschnitt der Pharm. Prüfung 21.03.81 2.Abschnitt der Pharm. Prüfung
praktische Ausbildung	4.81 - 10. 81 Römer - Apotheke, Arloff 11. 81 - 3.82 Bayer AG Leverkusen
Staatsexamen	21.04.82
Approbation	28.06.82
Promotion	Beginn April 1982, Institut für Pharm. Technologie
Berufstätigkeit	3. 82 - 3.83 wissenschaftliche Hilfskraft 4. 83 - 4.85 wissenschaftlicher Mitarbeiter